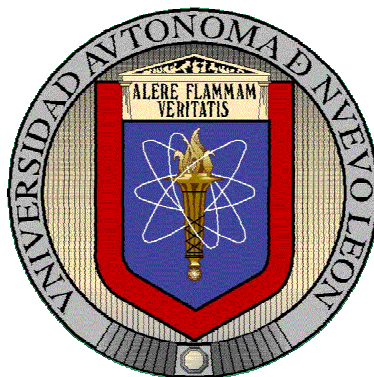


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**



**SECUENCIA DE LA TANASA DE *Aspergillus niger* GH1 Y  
PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA EN *Pichia pastoris***

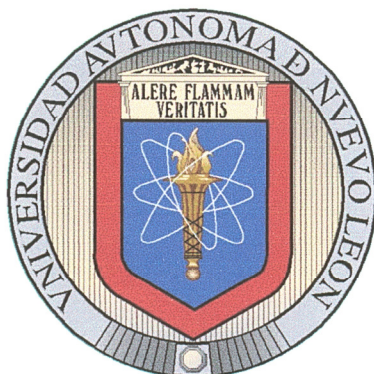
**Por:**

**M.C. José Antonio Fuentes Garibay**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS  
con Especialidad en Biotecnología**

**Marzo, 2015**

**SECUENCIA DE LA TANASA DE *Aspergillus niger* GH1 Y  
PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA EN *Pichia pastoris***



**Comité de tesis:**

---

**DR. JOSÉ MARÍA VIADER SALVADÓ**  
Presidente

---

**DRA. MARTHA GUERRERO OLAZARÁN**  
Secretario

---

**DR. BENITO PEREYRA ALFÉREZ**  
Vocal 1

---

**DRA. LILIA HORTENSIA MORALES RAMOS**  
Vocal 2

---

**DRA. MARIA MAGDALENA IRACHETA CÁRDENAS**  
Vocal 3

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**



**SECUENCIA DE LA TANASA DE *Aspergillus niger* GH1 Y  
PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA EN *Pichia pastoris***

**Presenta**

**M.C. José Antonio Fuentes Garibay**

**DRA. JOSÉ MARÍA VIADER SALVADÓ**  
**Director**

**DRA. MARTHA GUERRERO OLAZARÁN**  
**Co-Director**

**DR. CRISTÓBAL NOÉ AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Asesor Externo**

**Marzo, 2015**

## LUGAR DE TRABAJO

**El presente trabajo titulado “Secuencia de la tanasa de *Aspergillus niger* GH1 y producción de la enzima en *Pichia pastoris*” se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Molecular (L5) del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la Dirección del Dr. José María Viader Salvadó, la Co-dirección de la Dra. Martha Guerrero Olazarán, y la asesoría del Dr. Cristóbal Noé Aguilar González.**

*Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a Él*  
Louis Pasteur (1822-1895)

*Nada es demasidao maravilloso para ser cierto si obedece a las leyes de la naturaleza*  
Michael Faraday (1791-1867)

*¡Ven aquí! ¡Date prisa! ¡En el agua de lluvia unos bichitos!... ¡nadan! ¡dan vueltas!... ¡Son mil veces más pequeños que cualquiera de los bichos que podemos ver a simple vista!... ¡mira lo que he descubierto!*  
Anton Van Leeuwenhoek (1632-1723)

**Parte del presente trabajo ha sido presentado en forma de exposición oral en el siguiente congreso:**

José Antonio Fuentes-Garibay, Martha Guerrero-Olazarán, Cristóbal Noé Aguilar-González, Raúl Rodríguez-Herrera, José María Viader-Salvadó. XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C., Cancún, QR. (México), 23-28- de junio de 2013.

**Además, ha sido publicado en la revista Molecular Biotechnology.**

José Antonio Fuentes-Garibay, Cristóbal N. Aguilar-González, Raúl Rodríguez-Herrera, Martha Guerrero-Olazarán, José María Viader-Salvadó. 2015. Tannase sequence from a xerophilic *Aspergillus niger* strain and production of the enzyme in *Pichia pastoris*. Molecular Biotechnology, 1-9. doi: 10.1007/s12033-014-9836-z. Print ISSN: 1073-6085. Online ISSN: 1559-0305. Publisher: Springer US.

## AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento sincero y muy especial al Dr. José María Viader Salvadó, por soportarme todos estos años. Gracias por sus consejos, su paciencia, sus enseñanzas, su apoyo y ayudas desinteresadas, por ser alguien con una gran calidad humana. No tengo palabras para agradecerle todo lo que ha hecho, no cabe duda que la noble labor de enseñanza es su vocación. Es un privilegio tenerlo como Maestro. Muchas gracias!

A la Dra. Martha Guerrero Olazarán por mostrarme su apoyo cuando lo he necesitado, por ser una guía, por ser un ejemplo de constancia, trabajo y sobretodo ejemplo de fortaleza.

Al Dr. Cristóbal Noé Aguilar González y al Dr. Raúl Rodríguez Herrera, quienes muy amablemente proporcionaron el DNA genómico de *Aspergillus niger* GH1, punto clave que dio origen al buen desarrollo posterior del trabajo, por sus aportaciones importantes, consejos, apoyo, ideas y consejos brindados, los cuales fueron de mucha ayuda para la realización del presente trabajo.

A la Dra. Fabiola Veana Hernández que en el tiempo de realización del trabajo amablemente me apoyo en muchas labores cuando yo no veía salida o tenía alguna complicación. Por esas buenas pláticas que terminaban de pronto en carcajadas y que ayudaron a aligerar la carga de trabajo.

Al M.C. Luis Victor Rodríguez Durán por sus consejos brindados en los aspectos de actividad enzimática así como de cromatografía, sugerencias muy valiosas.

A los Dres. Miguel y Mauricio Castillo Galván por su desinteresada ayuda cuando lo necesité en el uso del equipo de cromatografía y de la programación del mismo.

Al QFB. Moisés Shabot Szydlo, por toda esa gran disposición de ayuda, sus aportaciones, su iniciativa. Muchísimo éxito en tus estudios y tu vida profesional. Al estudiante Martín Tijerina quien fue un gran apoyo en una parte del desarrollo de este trabajo y que muchas veces brindo ayuda de manera generosa. Se les extraña!

A mis compañeros, ex-compañeros de laboratorio y miembros del grupo: L5 VIP: quienes fueron parte de esas reuniones clandestinas en las unidades ya conocidas: Ana "La Ley Herrera", *Fabiolaceae*, Eddy Luz, Diego Benitez, Mariana, Nerio, Nancy, Nestor, Miguel Valadez, Karla Fernández, Jonathan, Liliana Morán y Paquito. Cynthia, David C, Karla Soto, Ana chiquita, Francisco Javier y Karla A., a pesar que no formaron parte del todo del proceso en su momento, su llegada ha alegrado el laboratorio.

A mis compañeros y compañeras del IB: Dinora, Vivi, Adrianita, Orquídea, Marianita David Melgoza, Astrid, Julian, Fernando, Luisito e Iturielazo. Como olvidar al Tocayito.

Al CONACyT por la beca y el apoyo otorgado para la realización de este proyecto.

## ***Dedicatoria***

### ***Te agradezco Dios Padre...***

... Además de tu infinita bondad y amor, gracias por colmarme de bendiciones y poco a poco mostrarme el camino a seguir. Por esta vida tan maravillosa que me has dado, por darme la paciencia, la fuerza, la salud y sobretodo la vida y así permitirme para llegar a este momento. Gracias por ayudarme a comprender mis errores, corregirlos y ser mejor cada día. Gracias por permitirme estar al lado de mis seres queridos.

### ***A mis Padres:***

*Manuel Fuentes Fernández y Alicia Garibay Ruiz...*

... Porque a ustedes les debo todo, sus enseñanzas, fortaleza y carácter en cada reto que en la vida se presente. Porque con el amor que me han dado, los sacrificios que han hecho, junto con sus enseñanzas y consejos hacen que sea mejor persona cada día, Gracias por ese impulso constante para que juntos logremos nuestros sueños. Por demostrarme su amor y estar siempre a mi lado guiándome en mi camino, compartiendo mis triunfos y ayudándome a levantarme en las derrotas. Todo esto y más sin pedir nada a cambio.

### ***A mis hermanitos:***

*Alma, Manuel, Verónica, Cristina, Jorge y David...*

... Por brindarme apoyo incondicional en todo momento. Gracias por compartir conmigo todos esos bonitos momentos de alegrías así como de tristezas. Por ser un ejemplo a seguir, los quiero mucho.

### ***Mis diablillos:***

*Elias, Johan, Laura y Jessica...*

... Mis traviesos y queridos sobrinitos, por tener siempre un gran motivo para sonreír y no olvidarme que alguna vez también fui niño. Gracias a todos ustedes por ser mi familia.

### ***Rocio...***

... He aprendido mucho de ti, me hiciste tener una visión diferente de la vida. Siempre me alentaste que lo lograría. Gracias. Te quiero mucho...

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
LUGAR DE TRABAJO.....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	vi
<i>DEDICATORIA</i> .....	vii
LISTA DE TABLAS .....	xiii
LISTA DE FIGURAS .....	xv
LISTA DE ECUACIONES.....	xvii
NOMENCLATURA .....	xviii
RESUMEN.....	xx
ABSTRACT.....	xxi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. JUSTIFICACIÓN .....	3
3. HIPÓTESIS.....	4
4. OBJETIVOS .....	5
4.1 Objetivo general .....	5
4.2 Objetivos específicos .....	5
5. ANTECEDENTES.....	6
5.1 Taninos.....	6
5.2. Enzimas.....	8
5.3. Las tanasas .....	8
5.4. Mecanismo de acción de las tanasas .....	9
5.5. Características moleculares y bioquímicas de las tanasas.....	10
5.5.1. Masa molecular de las tanasas .....	10
5.5.2. pH y temperatura óptimos de las tanasas .....	10



5.5.3. Estructura de las tanasas .....	11
5.6. Aplicaciones de la tanasa y usos potenciales .....	12
5.7. Fuentes de tanasa.....	13
5.8. Producción de la tanasa.....	14
5.9 Tanasa de <i>Aspergillus niger</i> GH1 .....	15
5.10. <i>P. pastoris</i> como hospedero para la producción de proteínas recombinantes...	16
5.11. Síntesis de tanasa en cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> .....	17
6. MÉTODOS .....	19
6.1. Cepas, plásmidos, composición de medios, reactivos químicos y enzimas.....	19
6.2. Equipo .....	20
6.3. Estrategia general .....	21
6.4. Determinación de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la tanasa nativa de <i>A. niger</i> GH1 .....	23
6.4.1. Obtención del DNA genómico de <i>A. niger</i> GH1 .....	23
6.4.2. Síntesis por PCR de la secuencia que codifica para la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 .....	24
6.4.3. Clonación de la secuencia que codifica para la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 .....	25
6.4.4. Caracterización del plásmido construido pGEMANTGHI .....	26
6.4.4.1. Preparación del DNA plasmídico de pGEMANTGHI .....	26
6.4.4.2. Caracterización del plásmido pGEMANTGHI por PCR .....	27
6.4.5. Determinación de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 .....	28
6.4.5.1. Secuenciación parcial del fragmento ANTGHI .....	28
6.4.5.2. Secuenciación de la región central de la secuencia que codifica para la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 .....	29
6.4.6. Análisis computacional de la secuencia aminoacídica de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 .....	31
6.5. Diseño y construcción de un gen sintético (ANTGs) que codifica para la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 .....	32
6.6. Clonación del gen sintético que codifica para la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 en un vector del sistema de expresión de <i>P. pastoris</i> .....	33

6.6.1. Inducción de células de <i>E. coli</i> CopyCutter EPI400 para generar alto número de copias de plásmido .....	33
6.6.2. Diseño de oligonucleótidos para facilitar la síntesis por PCR y clonación del fragmento <i>ANTgs</i> en un vector de clonación .....	34
6.6.3. Síntesis por PCR del fragmento <i>ANTgs</i> .....	35
6.6.4. Adenilación del fragmento <i>ANTgs</i> .....	37
6.6.5. Clonación del fragmento <i>ANTgs</i> en el vector pGEM.....	38
6.6.6. Caracterización del plásmido pGEM <i>ANTgs</i> construido .....	39
6.6.6.1. Preparación del plásmido pGEM <i>ANTgs</i> .....	39
6.6.6.2. Caracterización del plásmido pGEM <i>ANTgs</i> por PCR .....	39
6.6.6.3. Caracterización del plásmido pGEM <i>ANTgs</i> mediante digestión con las enzimas <i>Bam</i> HI y <i>Avr</i> II.....	40
6.6.7. Subclonación del fragmento <i>ANTgs</i> en el vector pPIC9.....	41
6.6.7.1. Estrategia de clonación .....	41
6.6.7.2. Preparación de los plásmidos de pGEM <i>ANTgs</i> y pPIC9 <i>TgQ</i> .....	42
6.6.7.3. Digestión preparativa de los plásmidos pGEM <i>ANTgs</i> y pPIC9 <i>TgQ</i> con las enzimas <i>Bam</i> HI y <i>Avr</i> II .....	43
6.6.7.4. Ligación del fragmento <i>ANTgs</i> con el vector pPIC9 y transformación en <i>E. coli</i> .....	45
6.6.7.5. Caracterización del plásmido pPIC9 <i>ANTgs</i> construido .....	46
6.7. Construcción de cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> portadoras del gen sintético <i>ANTgs</i> capaces de producir y secretar la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 .....	47
6.7.1. Preparación a mediana escala del plásmido pPIC9 <i>ANTgs</i> .....	48
6.7.2. Transformación de <i>P. pastoris</i> KM71.....	50
6.7.3. Caracterización genotípica de las cepas recombinantes KM71 <i>ANT</i> .....	51
6.7.4. Caracterización fenotípica (fenotipo <i>ANT</i> <sup>+</sup> ) de las cepas recombinantes KM71 <i>ANT</i> .....	53
6.7.4.1. Cultivo bajo condiciones de inducción del gen heterólogo de las cepas KM71 <i>ANT</i> .....	54
6.7.4.2. Concentración de proteínas totales en el medio de cultivo libre de células.....	55
6.7.4.3. Determinación de la actividad enzimática de tanasa.....	57
6.7.4.4. Producción de tanasa extracelular en cultivos de KM71 <i>ANT</i> en condiciones de inducción del gen heterólogo .....	60
6.8. Caracterización bioquímica de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 recombinante.....	61
6.8.1. Estrategia experimental.....	61
6.8.2. Concentrado enzimático de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 recombinante.....	62
6.8.3. Determinación de la masa molecular aparente de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 recombinante .....	63

6.8.4. Presencia de posibles N-glicosilaciones en la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 recombinante .....	63
6.8.5. Análisis de proteínas por SDS-PAGE.....	64
6.8.6. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 recombinante .....	65
6.8.7. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 recombinante .....	66
6.8.8. Estabilidad de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 recombinante.....	66
6.8.9. Determinación de la actividad específica de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 recombinante .....	67
6.8.10. Constates cinéticas de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 recombinante .....	68
7. RESULTADOS.....	69
7.1. Determinación de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la tanasa nativa de <i>Aspergillus niger</i> GH1 .....	69
7.1.1. Obtención del DNA genómico para la amplificación y determinación de la secuencia nucleotídica que codifica para la tanasa de la cepa GH1 de <i>Aspergillus niger</i> .....	69
7.1.2. Síntesis por PCR del fragmento <i>ANTGHI</i> .....	69
7.1.3. Construcción y caracterización del vector pGEMANTGHI .....	70
7.1.4. Secuenciación del gen que codifica para la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 .....	72
7.1.5. Análisis computacional de la secuencia aminoacídica de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 .....	87
7.2. Diseño y construcción de una secuencia nucleotídica <i>ANTgs</i> que codifica para la tanasa de <i>Aspergillus niger</i> GH1 .....	88
7.2.1. Construcción, transformación y caracterización de los vectores pUC57ANTgs y pGEMANTgs .....	88
7.2.2. Subclonación del fragmento <i>ANTgs</i> en el vector pPIC9.....	92
7.3. Construcción de cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> portadoras del fragmento <i>ANTgs</i> (KM71ANT) .....	96
7.3.1. Transformación de la cepa KM71 de <i>P. pastoris</i> con el vector de expresión construido.....	96
7.3.2. Análisis por PCR del genotipo de las cepas recombinantes obtenidas .....	97
7.3.3. Cultivo bajo condiciones de inducción del gen heterólogo de la cepa KM71ANT: Fenotipo ANT <sup>+</sup> .....	98
7.4. Caracterización bioquímica de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 recombinante.....	98

7.4.1. Semipurificación de la tanasa recombinante por ultrafiltración .....	98
7.4.2. Determinación de la masa molecular aparente de la tanasa recombinante, predicción y evaluación experimental de la N-glicosilación y posible forma bicatenaria .....	99
7.4.3. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la tanasa recombinante....	100
7.4.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la tanasa recombinante .....	101
7.4.5. Estabilidad de la tanasa recombinante .....	101
7.4.6. Determinación de la actividad específica de la tanasa recombinante .....	102
7.4.7. Constantes cinéticas de la tanasa recombinante.....	103
8. DISCUSIÓN .....	104
9. CONCLUSIONES .....	111
10. PERSPECTIVAS .....	113
APÉNDICES .....	114
APÉNDICE A: Preparación de medios, soluciones y reactivos .....	114
APÉNDICE B: Plásmido pGEMANT <i>GH1</i> .....	121
APÉNDICE C: Plásmido pGEMANT <i>gs</i> .....	122
APÉNDICE D: Plásmido pPIC9ANT <i>gs</i> .....	123
APÉNDICE E: Secuencia nucleotídica y aminoácidica de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 .....	124
APÉNDICE F: Secuencia nucleotídica de pPIC9.....	126
LITERATURA CITADA.....	129
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO .....	139

## LISTA DE TABLAS

Tabla I. Microorganismos productores de tanasa (adaptado de Bhat <i>et al.</i> , 1998) .....	14
Tabla II. Oligonúcleotidos empleados en el presente trabajo .....	22
Tabla III. Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR estandarizada con GoTaq DNA polimerasa para síntesis de la secuencia que codifica para la tanasa de <i>A. niger</i> GH1.....	24
Tabla IV. Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para verificar la amplificación de la secuencia que codifica para la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 con GoTaq DNA polimerasa. ....	25
Tabla V. Mezcla de reacción de ligación del producto amplificado con el vector pGEM- T .....	25
Tabla VI. Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR estandarizada con GoTaq DNA polimerasa para la caracterización de pGEMANTGHI.....	28
Tabla VII. Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR con <i>Pfu</i> Ultra II DNA polimerasa para la amplificación del fragmento <i>ANTgs</i> .....	36
Tabla VIII. Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para verificar la....	36
Tabla IX. Mezcla de reacción de adenilación del producto amplificado.....	37
Tabla X. Mezcla de reacción para la ligación del fragmento <i>ANTgs</i> en el vector pGEM-T vector.....	38
Tabla XI. Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR estandarizada con GoTaq DNA polimerasa para la caracterización de pGEMANTgs. .....	40
Tabla XII. Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para verificar la amplificación del fragmento <i>ANTgs</i> con GoTaq DNA polimerasa. ....	40
Tabla XIII. Tamaños teóricos esperados para la caracterización de pGEMANTgs con <i>Bam</i> HI y <i>Avr</i> II.....	41
Tabla XIV. Mezcla de reacción de la digestión analítica del plásmido pGEMANTgs con <i>Bam</i> HI y <i>Avr</i> II.....	41
Tabla XV. Mezcla de reacción de la digestión preparativa de pPIC9TgQ y pGEMANTgs con <i>Bam</i> HI y <i>Avr</i> II. ....	44
Tabla XVI. Fragmentos teóricos esperados en la digestión preparativa de pPIC9TgQ y pGEMANTgs con <i>Bam</i> HI y <i>Avr</i> II .....	45
Tabla XVII. Componentes de la reacción de ligación del fragmento <i>ANTgs</i> con el vector pPIC9. ....	46
Tabla XVIII. Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR para la caracterización del plásmido pPIC9ANTgs.....	47
Tabla XIX. Mezcla de reacción en la digestión preparativa de pPIC9ANTgs con <i>Sal</i> I...	49
Tabla XX. Parámetros de electroporación empleados en la transformación del vector linearizado con células de <i>P. pastoris</i> . ....	51
Tabla XXI. Volúmenes y reactivos necesarios para el análisis de integración por medio de PCR con iniciadores dirigidos a las regiones de AOX1.....	52

Tabla XXII. Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para verificar la integración del cassette de expresión en el genoma de <i>P. pastoris</i> .....	53
Tabla XXIII. Composición de los medios de cultivo utilizados. ....	55
Tabla XXIV. Resumen de las condiciones experimentales de los cultivos en matraz de KM71ANT. ....	55
Tabla XXV. Mezcla de reacción para la determinación de la curva de calibración del método de Bradford.....	56
Tabla XXVI. Mezcla de reacción e incubación para la determinación actividad enzimática de tanasa.....	59
Tabla XXVII. Curva de calibración para la determinación de ácido gálico liberado en los ensayos de actividad enzimática de tanasa.....	59
Tabla XXVIII. Reactivos empleados en la reacción de desnaturalización. ....	64
Tabla XXIX. Reactivos empleados en la reacción de N-desglicosilación.....	64
Tabla XXX. Volúmenes para la realización de los geles de poliacrilamida. ....	65
Tabla XXXI. Evaluación del proceso de obtención de un concentrado enzimático de tanasa recombinante. ....	98

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la hidrólisis de los taninos hidrolizables por una tanasa. ....	9
Figura 2. Modelo de las modificaciones postraduccionales de la tanasa de <i>A. oryzae</i> . ...	11
Figura 3. Representación esquemática de la estrategia general. ....	23
Figura 4. Esquema del diseño de oligonucleótidos centrales para la secuenciación completa de la secuencia que codifica para la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 ( <i>ANTGHI</i> ). ...	31
Figura 5. Determinación de la secuencia nucleotídica completa de la secuencia que codifica para la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 ( <i>ANTGHI</i> ) mediante el traslape de secuencias por el módulo <i>CAP</i> de <i>BioEdit</i> . ....	31
Figura 6. Representación esquemática de la inducción de células de <i>E. coli</i> CopyCutter EPI400 para generar alto número de copias del plásmido pUC57 <i>ANTgs</i> . ....	34
Figura 7. Estrategia utilizada para la construcción del plásmido pPIC9 <i>ANTgs</i> . ....	42
Figura 8. Representación gráfica del plásmido pPIC9 <i>ANTgs</i> y los sitios de apareamiento de los iniciadores específicos 5' AOX y 3' AOX. ....	53
Figura 9. Representación esquemática del protocolo experimental para los cultivos de la determinación del fenotipo ANT <sup>+</sup> y la posterior caracterización bioquímica de la enzima producida .....	55
Figura 10. Representación general de las reacciones para la determinación de actividad enzimática de tanasa. ....	58
Figura 11. Representación general de la determinación de actividad enzimática de tanasa. ....	58
Figura 12. Representación esquemática de la estrategia experimental para la caracterización bioquímica. ....	62
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X del DNA genómico aislado de la cepa de <i>A. niger</i> GH1. ....	69
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X del producto amplificado correspondiente a la síntesis del fragmento <i>ANTGHI</i> empleando <i>GoTaq</i> DNA polimerasa. ....	70
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la integridad del DNA plasmídico aislado de clonas transformadas con el producto de la ligación de el vector pGEM y el fragmento <i>ANTGHI</i> . ....	71
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X del producto amplificado correspondiente a la síntesis del fragmento <i>ANTGHI</i> empleando <i>GoTaq</i> DNA polimerasa. ....	71
Figura 17. Alineamiento de las cinco secuencias obtenidas con el oligonucleótido T7. ....	73
Figura 18. Alineamiento de las cinco secuencias obtenidas con el oligonucleótido SP6. ....	74
Figura 19. Secuencia de los iniciadores necesarios para amplificar la región central. ....	74
Figura 20. Simulación de la PCR mediante la plataforma Primer BLAST. ....	75
Figura 21. Identidad de los iniciadores con la secuencia molde. ....	75

Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en TBE 1X de la caracterización por PCR del vector pGEMANTGHI con los oligonucleótidos centrales diseñados a partir de la secuencia parcial obtenida..	76
Figura 23. Alineamiento realizado con el modulo CAP de Bioedit entre las secuencias obtenidas por secuenciación de cinco plásmidos pGEMANTGHI con los iniciadores T7 y SP6, y cuatro plásmidos pGEMANTGHI con los iniciadores 5'TanC1 y 3'TanC2.	80
Figura 24. Traducción del fragmento ANTGHI	82
Figura 25. Alineamiento múltiple de la secuencia nucleotídica de <i>A. niger</i> GH1 las con las seis secuencias de tanasas fúngicas que presentaron mayor identidad con la tanasa de <i>A. niger</i> GH1.	84
Figura 26. Alineamiento múltiple de la secuencia de <i>A. niger</i> GH1 las con las seis secuencias de tanasas fúngicas que presentaron mayor identidad con la tanasa de <i>A. niger</i> GH1.	85
Figura 27. Alineamiento entre la secuencia de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 y la secuencia de la tanasa de <i>A. kawachi</i> IFO4308.	86
Figura 28. Modelaje molecular de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1.	88
Figura 29. Mapa del vector pUC57ANTgs	89
Figura 30. Análisis en gel de agarosa para verificar la integridad del DNA plasmídico aislado de células de <i>E. coli</i> Coppy Cutter 400 transformadas con el vector pUC57ANTgs.	89
Figura 31. Secuencia de los iniciadores 3'ALFAGSB y 5'TANGSA diseñados.	90
Figura 32. Simulación de la PCR mediante la plataforma Primer BLAST.	90
Figura 33. Identidad de los iniciadores con la secuencia molde.	91
Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de las etapas experimentales para la construcción del vector pGEMANTgs.	92
Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de las etapas experimentales para subclonar el fragmento ANTgs en el vector pPIC9.	93
Figura 36. Análisis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de pPIC9ANTgs.	94
Figura 37. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la caracterización por PCR con los iniciadores 5'ALFAGSB y 3'TANGSA del plásmido pPIC9ANTgs construido.	94
Figura 38. Representación gráfica del vector de expresión pPIC9ANTgs.	95
Figura 39. Verificación del corte total del vector de expresión pPIC9ANTgs con SalI en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X.	96
Figura 40. Verificación de la integridad del DNA genómico aislado de cepas de <i>P. pastoris</i> KM71 transformadas con el vector pPIC9ANTgs.	97
Figura 41. Análisis de PCR del DNA genómico aislado de las colonias de cepas KM71ANT.	97
Figura 42. Análisis por SDS-PAGE al 12% concentrado enzimático obtenido por ultrafiltración tratado y sin tratar con la glicosidasa endo H <sub>f</sub> .	99
Figura 43. Predicción de los sitios potenciales de N-glicosilación de la secuencia aminoacídica de la tanasa de <i>A. niger</i> GH1 con el programa NetNGlyc 1.0.	100
Figura 44. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la tanasa recombinante a 30°C.	100
Figura 45. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la tanasa recombinante a pH 5.0.	101



Figura 46. Actividad residual de la tanasa recombinante a 30 (●) y 4°C (■)..	102
Figura 47. Cromatograma de intercambio aniónico del concentrado enzimático de tanasa recombinante..	103

## LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Cálculo de la cantidad de inserto (ng) necesarios para la ligación en el vector pGEM.....	38
Ecuación 2. Cálculo de la absorbancia del ácido gálico liberado. ....	60
Ecuación 3. Cálculo de la concentración de ácido gálico liberado. ....	60
Ecuación 4. Cálculo de la actividad volumétrica de tanasa. ....	60
Ecuación 5. Cálculo de la actividad residual de tanasa.....	66
Ecuación 6. Cálculo de la actividad específica de la tanasa purificada. ....	67

## NOMENCLATURA

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
µg/mL	Microgramos por mililitro
µL	Microlitros
µM	Micromolar
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
AE	Actividad específica
AOX	Alcohol oxidasa
<i>AOX1</i>	Gen que codifica para la AOX1
<i>AOX2</i>	Gen que codifica para la AOX2
AGL	Ácido gálico liberado
CAGL	Concentración de ácido gálico liberado
ART	Actividad residual de tanasa
ASB	Albúmina sérica bovina
AVT	Actividad volumétrica de tanasa
BMG	Medio mínimo amortiguado, adicionado con glicerol
BMM	Medio mínimo amortiguado, adicionado con metanol
CAGL	Concentración de ácido gálico liberado
CP	Concentración de proteínas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO <sub>520 nm</sub>	Densidad óptica a 520 nm
DO <sub>595 nm</sub>	Densidad óptica a 595 nm
DO <sub>600 nm</sub>	Densidad óptica a 600 nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i> (y otros)
g	Número de veces la fuerza gravitacional
g	Gramos
g/L	Gramos por litro
GoTaqDNA polimerasa	DNA polimerasa obtenida de <i>Thermus aquaticus</i> . Enzima encargada de construir nuevas cadenas de DNA
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
His <sup>+</sup>	Fenotipo <i>HIS4</i> positivo
<i>HIS4</i>	Gen de la histidinol deshidrogenasa
<i>his4</i>	Gen de la histidinol deshidrogenasa defectuoso o mutado
IPTG	Isopropilthio-β-D-galactósido
kb	Kilobase = Mil pares de bases
kDa	Kilodaltones = Mil daltones
Kex2	Proteasa dependiente de Ca <sup>2+</sup> unida a membrana
Km	Constante de Michaelis
KM71ANT	Cepa recombinante de <i>P. pastoris</i> productora y secretora de la tanasa de <i>Aspergillus niger</i> GH1
KM71TgQ	Cepa recombinante de <i>P. pastoris</i> productora y secretora de un tripsinógeno quimérico
KOH	Hidróxido de potasio

L	Litro, unidad de volúmen
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
M	Marcador de peso molecular o concentración expresada en molar
mA	Miliamperes
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
mg/L	Miligramos por litro
mg/mL	Miligramos por mililitro
min	Minutos
mM	Concentración milimolar
mm	Milímetros
Mut <sup>+</sup>	Fenotipo de utilización de metanol positivol
Mut <sup>s</sup>	Fenotipo de utilización de metanol lento
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NCBI	NationalCenter for Biotechnology Information
ng	Nanogramos
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>Pfu</i> polimerasa	DNA polimerasa de alta fidelidad obtenida de <i>Pyrococcus furiosus</i> . Enzima encargada de construir nuevas cadenas de DNA
pH	Potencial de iones hidrógeno
PSA	Persulfato de amonio
RDB	Medio de regeneración básico de dextrosa sin histidina
RDHB	Medio de regeneración básico de dextrosa con histidina
<i>RNA'asa</i>	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
S	Desviación estándar
s	Segundos
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
<i>sp</i>	Especie
Std	Estándares
TE	Amortiguador de pH Tris-HCl con EDTA
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSNT	Tritón-SDS-NaCl-Tris-HCl
U	Unidades enzimáticas
U/mg	Unidades por miligramo de proteína
U/mL	Unidades por mililitro
UV	Radiación ultravioleta
VIS	Radiación visible
Vmax	Velocidad máxima
X	Número de veces la concentración
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido
YNB	Base nitrogenada de levadura
YPD	Medio de cultivo con extracto de levadura, peptona y dextrosa

## RESUMEN

Las tanasas o tanin acil-hidrolasas (EC 3.1.1.20), son enzimas con potencial biotecnológico. En el presente trabajo, se describen las secuencias nucleotídica y aminoacídica de la tanasa de *Aspergillus niger* GH1. Además, se construyeron cepas recombinantes de *Pichia pastoris* capaces de producir y secretar la enzima, y la tanasa producida fue caracterizada bioquímicamente. La secuencia nucleotídica que codifica para la tanasa madura tuvo un tamaño de 1686 pb, y codifica para una proteína de 562 aminoácidos. Un modelo molecular de la proteína madura de la tanasa de *A. niger* GH1 mostró la presencia de dos dominios estructurales, uno de ellos con un plegamiento  $\alpha/\beta$ -hidrolasas y un dominio de tapa que cubre el sitio catalítico, siendo probable que los residuos Ser-196, Asp-448, e His-494 conformen la triada catalítica, la cual está conectada por medio de un puente disulfuro entre las cisteínas vecinas, Cys-195 y Cys-495. Un cultivo a nivel matraz de 120 mL con una cepa recombinante de *P. pastoris* construida mostró una actividad de tanasa extracelular a las 48 h de inducción de 0.57 U/mL. La tanasa producida fue N-glicosilada, consistió de dos subunidades, probablemente unidas por un puente disulfuro y presentó un pH óptimo de 5.0, y una temperatura óptima de 20°C. Estas propiedades bioquímicas difieren de las propiedades de la tanasa nativa de *A. niger* GH1. La tanasa recombinante podría ser adecuada para aplicaciones en alimentos y bebidas.

## ABSTRACT

Tannin acyl hydrolases, or tannases (EC 3.1.1.20), are enzymes with potential biotechnological applications. In this work, we describe the gene and amino acid sequences of the tannase from *Aspergillus niger* GH1. In addition, we engineered *Pichia pastoris* strains to produce and secrete the enzyme, and the produced tannase was characterized biochemically. The nucleotide sequence of mature tannase had a length of 1686 bp, and encodes a protein of 562 amino acids. A molecular model of mature *A. niger* GH1 tannase showed the presence of two structural domains, one with an  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold and one lid domain that covers the catalytic site, likely being residues Ser-196, Asp-448, and His-494 the putative catalytic triad, which are connected by a disulfide bond between the neighboring cysteines, Cys-195 and Cys-495. A 120 mL shake flask culture with a constructed recombinant *P. pastoris* strain showed extracellular tannase activity at 48 h induction of 0.57 U/mL. The produced tannase was N-glycosylated, consisted of two subunits, likely linked by a disulfide bond, and had an optimum pH of 5.0 and optimum temperature of 20°C. These biochemical properties differed from those of native *A. niger* GH1 tannase. The recombinant tannase could be suitable for food and beverage applications.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El empleo de enzimas en el procesado de alimentos y bebidas es una práctica ampliamente extendida en la industria alimenticia. La producción de enzimas recombinantes a través de procesos controlados garantiza una mejor calidad de estas enzimas a diferencia de su obtención de sus fuentes naturales donde la materia prima varía de lote a lote. Por otro lado, la producción de enzimas a partir de los microorganismos nativos generalmente se enfrenta a la problemática de bajos niveles de producción y alto grado de contaminación, por lo cual la vía de producción de proteínas recombinantes es cada vez una alternativa más adecuada para tener productos enzimáticos con un alto grado de homogeneidad. Proteínas que antes se creía imposible su producción por su difícil recuperación y fácil contaminación con otras proteínas de su fuente de origen, se pueden actualmente producir como proteínas recombinantes. Los avances de la ingeniería genética junto con la tecnología del DNA recombinante han permitido producir proteínas de forma recombinante en mayor cantidad, estabilidad y pureza que de su fuente natural, sin pasar desapercibido su costo económicamente accesible. Las tanasas catalizan la reacción de hidrólisis de enlaces éster presentes en galotaninos, taninos y ésteres del ácido gálico. Estas enzimas son utilizadas en el procesado de alimentos y bebidas, así como en la industria farmacéutica y química. Sin embargo, su uso práctico aún es muy limitado debido al escaso conocimiento que se tiene sobre esta enzima ocasionado por la complejidad de los procesos de producción y purificación que actualmente giran en torno a la misma. La mayor aplicación comercial de esta enzima se encuentra en la fabricación de té instantáneo y en la producción de ácido gálico. El ácido gálico es un intermediario clave en la síntesis del trimetoprim, un antibactericida importante, y como sustrato para la síntesis enzimática de galato de propilo, un potente antioxidante. Actualmente la principal aplicación de los organismos

recombinantes es la producción de proteínas, ya que muchas de éstas poseen gran valor comercial. En consecuencia, muchas de las investigaciones se han enfocado en la producción de proteínas recombinantes biológicamente activas de forma económica y sencilla. El sistema de expresión de *Pichia pastoris* ofrece una alternativa de producción a gran escala de enzimas recombinantes, debido a los altos niveles de producción y secreción que caracterizan a esta levadura. Dicho sistema de expresión combina muchas de las ventajas de los sistemas de expresión de los organismos superiores, con una sencilla y menos costosa manipulación con fines biotecnológicos que otros sistemas de expresión de eucariotes superiores, lo que ha generado un incremento en el uso de esta levadura para producir proteínas recombinantes. Además, generalmente con *P. pastoris* se obtienen altos niveles de expresión. En el presente trabajo se propuso la producción de una tanasa identificada en la cepa GH1 de *Aspergillus niger*, aislada del suelo de la región semidesértica del estado de Coahuila, con el fin de tener una fuente de esta enzima de importancia en la industria alimenticia. La tanasa de *A. niger* GH1 ha mostrado tener la mayor actividad a condiciones extremas de pH y temperatura. Estas propiedades junto con su alta actividad específica y la alta afinidad que presenta hacia el ácido tánico hacen a la tanasa de *A. niger* GH1 una candidata potencial para ser producida en grandes cantidades para su posterior uso en aplicaciones industriales. La producción de la forma recombinante en *P. pastoris* ofrece una alternativa de producción debido a los altos niveles de producción y secreción que se obtienen con esta levadura. En el presente trabajo, se obtuvo la secuencia de la tanasa de *A. niger* GH1 con la que se construyó un modelo molecular y se analizaron aspectos estructurales y funcionales de dicha tanasa. Además, se construyeron cepas recombinantes de *P. pastoris* productoras de la tanasa de *A. niger* GH1 mediante el uso de un gen sintético con codones preferenciales de *P. pastoris*. Mediante ensayos de actividad enzimática de tanasa y análisis de SDS-PAGE en condiciones reductoras se demostró que la tanasa de *A. niger* GH1 se produce en *P. pastoris* y se secreta al medio de cultivo como una proteína bicatenaria funcionalmente activa. La tanasa recombinante producida fue caracterizada bioquímicamente a través de la evaluación del efecto del pH y temperatura en su actividad enzimática, así como la estabilidad de la enzima a 4 y 30°C, la actividad específica y los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$ .

## 2. JUSTIFICACIÓN

Debido a las múltiples aplicaciones potenciales de las tanasas y al escaso conocimiento sobre las mismas, en la actualidad existe una constante búsqueda de nuevas fuentes de estas enzimas con propiedades más deseables, tales como mayor estabilidad, mayor capacidad catalítica y bajo costo de producción. Una alternativa de producción a gran escala de una tanasa es la producción de una forma recombinante biológicamente activa.

La tanasa de *A. niger* GH1 ha mostrado tener la mayor actividad a condiciones extremas de pH y temperatura. Estas propiedades junto con su alta actividad específica y la alta afinidad que presenta hacia el ácido tánico, hacen a la tanasa de *A. niger* GH1 una candidata potencial para ser producida en grandes cantidades para su posterior uso en aplicaciones industriales.

La producción de una tanasa de forma recombinante en la levadura *Pichia pastoris* ofrece una alternativa de producción a gran escala de dicha enzima, debido a los altos niveles de producción y secreción que normalmente se obtienen con esta levadura, a su fácil manipulación genética y la posibilidad de efectuar cultivos a escala de laboratorio e industrial.



### 3. HIPÓTESIS

La secuencia aminoacídica de la tanasa de *A. niger* GH1 aportará información estructural y funcional de dicha enzima. Además, un gen sintético portando codones preferenciales para *P. pastoris*, diseñado usando la secuencia aminoacídica de la tanasa de *A. niger* GH1, permitirá la producción de esta enzima en *P.pastoris*

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Determinar la secuencia de la tanasa de la cepa GH1 de *A. niger*, producir la enzima en el sistema de expresión de *P.pastoris* y realizar una caracterización bioquímica de la enzima producida.

### **4.2 Objetivos específicos**

1. Determinar la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la tanasa nativa de *A. niger* GH1.
2. Diseñar y construir un gen sintético que codifique para la tanasa de *A. niger* GH1.
3. Clonar el gen sintético que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1 en un vector del sistema de expresión de *P. pastoris*.
4. Construir cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras del gen sintético capaces de producir y secretar la tanasa de *A. niger* GH1.
5. Realizar una caracterización bioquímica de la tanasa recombinante producida.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1 Taninos

Los taninos son compuestos polifenólicos de distintos pesos moleculares y están presentes de manera natural en el reino vegetal. Estos compuestos fenólicos difieren de otros por tener la habilidad para precipitar proteínas de las soluciones. En el reino vegetal estos taninos se encuentran en hojas, corteza y madera. Los taninos son considerados como metabolitos secundarios debido a que no juegan un papel directo en el metabolismo de la planta. Después de la lignina, los taninos son el segundo grupo más abundante de fenoles en las plantas. Las grandes cantidades de grupos hidroxil-fenólicos permite a los taninos formar complejos con las proteínas y en menor medida con otras macromoléculas como la celulosa y la pectina (Mueller-Harvey *et al.*, 1987., Lehka and lonsane 1997; Aguilar y Gutiérrez-Sanchez 2001). También los taninos son el cuarto grupo constitutivo más abundante después de la celulosa, hemicelulosa y lignina. Después de la lignina, los taninos son el grupo más abundante de compuestos fenólicos en plantas, y tienen un papel importante en la inmunidad de las plantas, por lo que las protege de los ataques microbianos (Aguilar *et al.*, 2001). Los taninos son divididos en cuatro grupos principales: galotaninos, elagitaninos, taninos condensados y taninos complejos. Los galotaninos son caracterizados por la presencia de distintas moléculas de ácidos orgánicos como el ácido gálico, digálico y los ácidos quebúlicos, esterificados con una molécula de glucosa. Los elagitaninos están constituidos por bloques de unidades de ácido elágico unidos a glucósidos. También han sido consideradas como elagitaninos a moléculas con un núcleo de ácido quínico en lugar de glucosa. Para mantener esta capacidad de unión, los galotaninos y elagitaninos pueden tener más de dos unidades constituyentes de ácidos esterificadas al núcleo de glucosa. Los galotaninos pueden ser fácilmente hidrolizados bajo condiciones levemente ácidas o alcalinas, también ya sea en agua caliente o enzimáticamente (López-Ríos *et al.*, 1984).

Los elagitaninos son más estables que los galotaninos. Los taninos condensados son compuestos complejos hechos de bloques de construcción de flavonoides usualmente de 2-50 que no son considerados como fácilmente hidrolizables (Ramírez-Coronel *et al.*, 2004). Entre los mayores constituyentes son los derivados de catequinas, como la cianidina y delfinidina, las cuales son responsables de las pruebas de astringencia de frutas y vinos (Sánchez., 2001). El efecto negativo de los taninos se relaciona no sólo con problemas de su sabor, sino también para nutrición animal debido a la capacidad conocida de los taninos de unirse a macromoléculas, haciéndolas por lo tanto indigeribles (Mendez 1984; Goel *et al.*, 2005). Esto resulta en la formación de complejos estables con enzimas y minerales requeridos por microorganismos ruminales (Goel *et al.*, 2007). El sabor amargo también es la razón por la cual el consumo de alimento se reduce. Sin embargo, bajas concentraciones de taninos en alimentación se ha mostrado que resultan en un incremento en la asimilación de nitrógeno en rumiantes representando velocidades más altas de crecimiento y de producción de leche (Nip y Burns., 1969). Los taninos complejos pueden ser generados a través de reacciones entre el ácido gálico o ácido elágico con catequinas o glucósidos. Los taninos tienen distintas actividades biológicas importantes, como lo es el mecanismo de defensa contra enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus. El sabor amargo que provocan los taninos ayuda a proteger a las plantas del ataque de los insectos y los herbívoros. Los principios activos de plantas medicinales amenudo están relacionados con compuestos polifenólicos. Desde tiempos antiguos, extractos de plantas ricos en taninos (té) han sido usados como medicina tradicional en China y Japón para prevenir la diarrea, sepsis, inflamación, hemorragia, y cáncer o bien como diuréticos (Chowdhury *et al.*, 2004). Los taninos fenólicos son también eficientes agentes quelantes de iones metálicos, por lo que son usados en el tratamiento por envenenamiento causado por metales pesados. Debido a su fuerte capacidad de unirse con proteínas, también han sido usados por cientos de años para el curtido (Aguilar *et al.*, 2007). El incremento de las cantidades de ácido tánico en el suelo tiene varios efectos perjudiciales en el desarrollo de la planta, que repercute en baja producción de cosechas. Los taninos también causan varios problemas nutricionales y de procesamiento como indigestibilidad, inhibición de reacciones enzimáticas y procesos microbianos esenciales como los necesarios para la elaboración de cerveza.

Por lo tanto, altas concentraciones de taninos disminuyen el consumo voluntario de alimentos, la eficiencia en la digestión y la productividad animal. (Joseph y Abolaji., 1997). Nip y Burns en 1969, reportaron que una baja concentración de taninos en los alimentos resulta en un incremento en la asimilación de nitrógeno en los organismos rumiantes, lo que impacta en tasas de crecimiento mayores y en la producción de leche. Adicionalmente, taninos en la dieta han sido implicados en el desarrollo de algunas formas de cáncer (Korpassy., 1961).

## **5.2. Enzimas**

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores biológicos, llevan a cabo reacciones bioquímicas a altas velocidades, no se consumen durante la reacción y en general presentan un elevado grado de especificidad. La fuente de obtención de las enzimas puede ser a partir de diferentes extractos de origen vegetal, animal o microbiano, siendo este último la fuente más importante. El estudio de enzimas en el campo de los alimentos es de primordial interés debido a que son responsables de algunos cambios químicos que sufren los alimentos, cambios que pueden resultar beneficios o perjudiciales.

## **5.3. Las tanasas**

Las enzimas tanasas o tanin acil hidrolasas (TAH), son hidrolasas (E.C.3.1.1.20) que catalizan la reacción de hidrólisis de enlaces éster de taninos hidrolizables y el ácido gálico (Lekha y Lonsane, 1997), produciendo nueve moléculas de ácido gálico y una de glucosa (Yamada *et al.*, 1968). Las TAH también catalizan la hidrólisis de enlaces ésteres presentes en galotaninos, elagitaninos y taninos complejos (Field y Lettinga., 1992; Bhat *et al.*, 1998). Las tanasas son hidrolasas intracelulares/extracelulares inducibles en la naturaleza y se encuentran ubicadas en la superfamilia de las esterasas (Aguilar *et al.*, 2007; Banerjee y Mahapatra, 2012).

#### 5.4. Mecanismo de acción de las tanasas

Las tanasas actúa sobre los taninos hidrolizando los enlaces tipo éster formados entre los grupos galoil y polihidroxicarboles o la unión entre dos grupos galoil (Aguilar y Gutiérrez-Sánchez, 2001; Kasieczka-Burnecka *et al.*, 2007). Las TAH catalizan la hidrólisis completa del ácido tánico a ácido gálico y glucosa. Los intermediarios en la reacción son la 1,2,3,4,6-pentagaloilglucosa, 2,3,4,6-tetragaloilglucosa, y dos tipos de monogaloilglucosa (Iibuchi *et al* 1972; Lekha y Lonsane, 1997). En la Figura 1 se muestra la representación esquemática de la hidrólisis de los taninos hidrolizables por las tanasa.

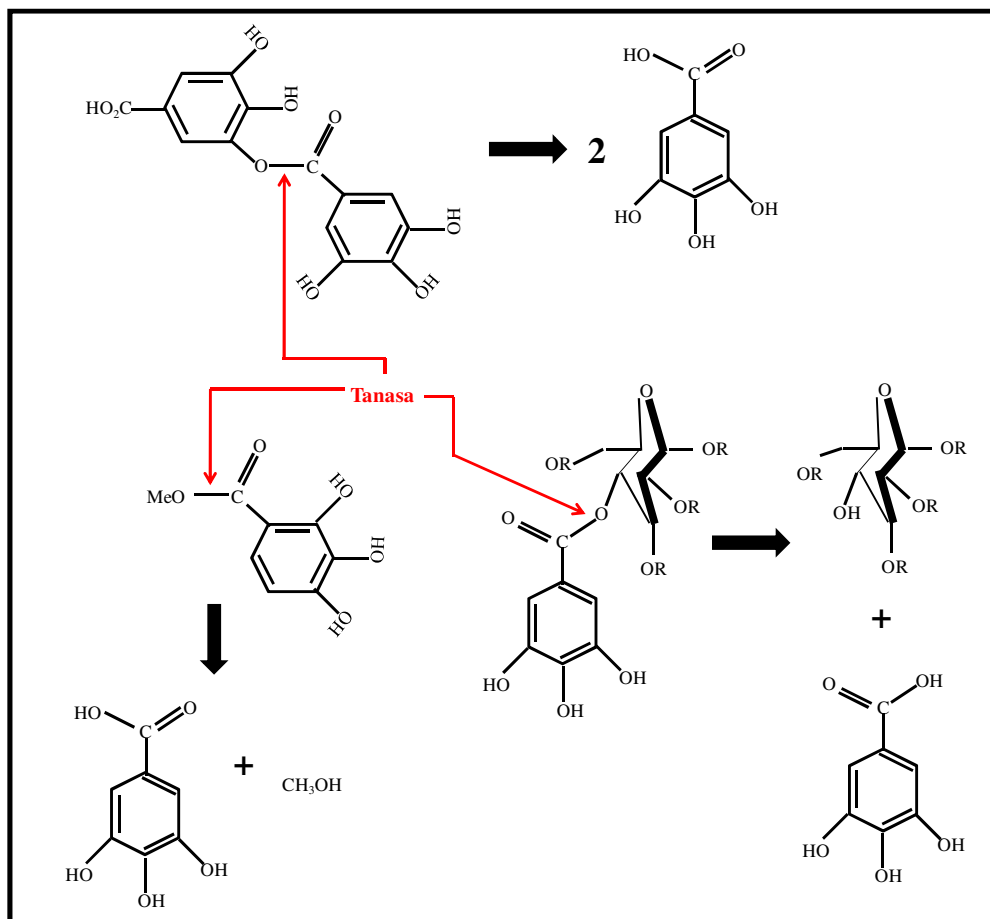


Figura 1. Representación esquemática de la hidrólisis de los taninos hidrolizables por una tanasa.

## **5.5. Características moleculares y bioquímicas de las tanasas**

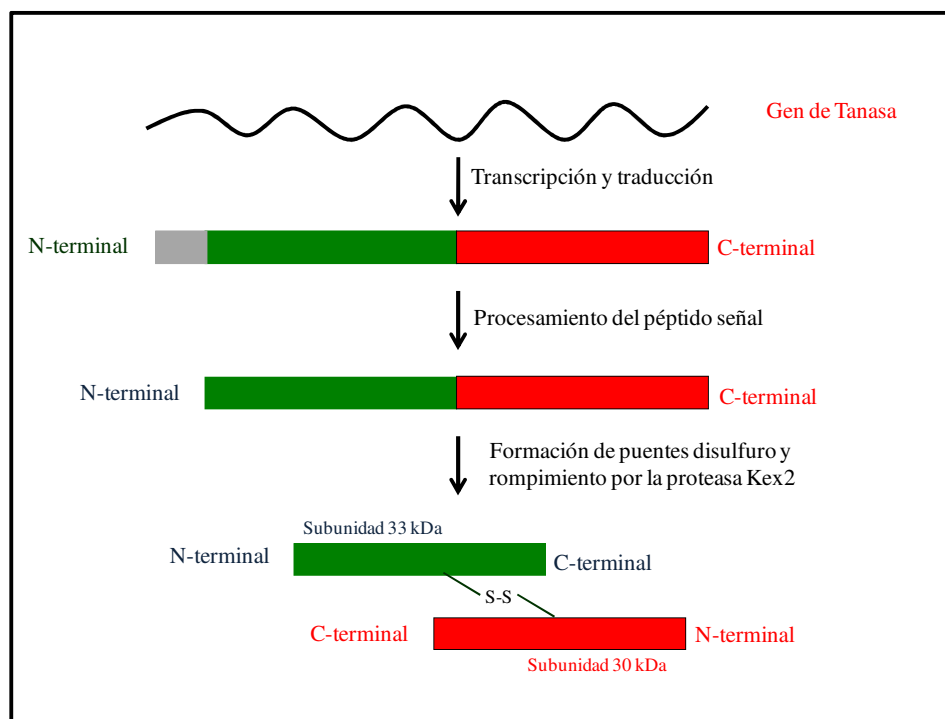
### **5.5.1. Masa molecular de las tanasas**

Las propiedades de las tanasas suelen ser diversas dependiendo del organismo productor. La masa molecular de algunas tanasas bacterianas están en un intervalo de 46.5-320 kDa (Skene y Brooker., 1995; Iwamoto *et al.*, 2008; Sivashanmugam y Jayaraman., 2011; Jana *et al.*, 2013; Boer *et al.*, 2009) y tienen forma monomérica en la naturaleza. Mientras que las tanasas de *Rhodococcus sp.* y *Lactobacillus plantarum* han sido reportadas como proteínas de dos subunidades (Nadaf y Ghosh, 2011; Wu *et al.*, 2013). Beniwal *et al.*, en 2013 reportó una tanasa de bajo peso molecular (31 kDa) de *Enterobacter cloacae*. Hasta la fecha, las tanasas caracterizadas de hongos y levaduras son glicoproteínas, mientras que las tanasas bacterianas parecen no presentar este tipo de modificaciones postraduccionales. Adicionalmente se han encontrado diferencias significativas en la glicosilación entre las tanasas producidas por el mismo microorganismo en diferentes sistemas de cultivo (Renovato *et al.*, 2011). Hatamoto *et al.*, en 1996 reportó la secuencia codificante de la tanasa de *Aspergillus oryzae*, y reportó que dicha secuencia no tiene intrones y codifica para una secuencia aminoacídica de 588 aminoácidos con una secuencia señal de 18 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 64 kDa. Dicha tanasa consistió de dos subunidades con masas moleculares de 30 y 33 kDa unidas por medio de un puente disulfuro. Dichos autores propusieron que la secuencia codificante se traduce como una cadena polipeptídica, posteriormente se remueven los 18 aminoácidos de la secuencia señal y la cadena polipeptídica se corta por medio de una proteasa tipo Kex2 en dos cadenas polipeptídicas (Figura 2).

### **5.5.2. pH y temperatura óptimos de las tanasas**

Muchas tanasas reportadas tienen una temperatura óptima de actividad entre 30-40°C, pero en algunos casos se ha reportado una temperatura óptima de 20°C (Kasieczka-Burnecka *et al.*, 2007) ó 70°C (Ramírez-Coronel *et al.*, 2003; Battestin y Macedo, 2007). En el caso del pH óptimo, su actividad máxima se presenta a valores de pH ácido (4.3-6.5), y en muchos de los casos son estables en un amplio intervalo de pH (3.0-7.0)

(Albertse, 2002; Barthomeuf *et al.*, 1994; Farías *et al.*, 1994; Ramírez-Coronel *et al.*, 2003).



**Figura 2. Modelo de las modificaciones postraduccionales de la tanasa de *A. oryzae*.**

### 5.5.3. Estructura de las tanasas

Recentemente se ha reportado la estructura tridimensional de la tanasa de *L. plantarum* (Ren *et al.*, 2013; Matoba *et al.*, 2013) mostrando que esta tanasa consiste en dos diferentes dominios estructurales, uno de ellos con un plegamiento de  $\alpha/\beta$ -hidrolasa y otro denominado como dominio de tapa (Matoba *et al.*, 2013). El sitio activo de esta tanasa fue encontrado en el dominio de  $\alpha/\beta$ -hidrolasa en el cual fueron identificados tres residuos de aminoácidos (Ser-163, Asp-419, e His-451) como la triada catalítica. La tanasa de *L. plantarum* tiene 18  $\alpha$ -helices, 13 cadenas  $\beta$ . (Ren *et al.*, 2013). Sin embargo, la secuencia de aminoácidos de la tanasa de *L. plantarum* tiene una baja identidad con las tanasas fúngicas (alrededor del 20%). Además, según la base de datos Pfam, la tanasa *L. plantarum* no tiene el dominio funcional de tanasa de la familia Tanasa PF07519 que presentan otras tanasas fúngicas. Por lo tanto, de acuerdo con Pfam, la tanasa de *L. plantarum* no está clasificada dentro de una familia de proteínas. Por otro lado, la base



de datos de la Superfamilias de anotaciones estructurales y funcionales para todas las proteínas y genomas clasifica a la tanasa de *L. plantarum* y la de *A.niger* dentro de la misma superfamilia SCOP ( $\alpha/\beta$ -hidrolasas, SCOP53474), pero en diferentes familias SCOP: similar a acetilcolinesterasa (SCOP 53475) para la tanasa de *L. plantarum* y proteína hipotética TT1662 (SCOP 102616) para la tanasa de *A.niger*. Por lo tanto, a pesar que estas dos tanasas comparten la misma función, se consideran como dos proteínas muy diferentes y se clasifican en diferentes familias, por lo que la estructura tridimensional de las tanasas fúngicas pudiera ser diferente a la estructura tridimensional reportada para la tanasa de *L. plantarum*.

## **5.6. Aplicaciones de la tanasa y usos potenciales**

Se han descrito muchas aplicaciones de las tanasas. La tanasa de *Aspergillus flavus* reduce dramáticamente la formación de neblina en la cerveza después del almacenamiento debido a que hidroliza los compuestos fenólicos del mosto que normalmente forman complejos con otros compuestos de la cerveza generando turbidez (Giovanelli.,1989). Al principio el vino era tratado químicamente para remover los compuestos fenólicos no deseados. Actualmente se emplean tanasas para hidrolizar el ácido clorogénico a ácido caféico y ácido quínico, los cuales influyen en el sabor del vino favorablemente (Chae *et al.*, 1983). Incluso el jugo de frutas está siendo tratado con una mezcla de lactasa y tanasa para estabilizar y clarificar el producto (Canterelli *et al.*, 1989). El ácido gálico es uno de los productos liberados tras la hidrólisis del ácido tánico por acción de una tanasa (Iibuchi *et al.*, 1972). El ácido gálico ha sido sintetizado químicamente, pero esta síntesis química es conocida por ser un proceso muy costoso y no siempre efectivo. Este compuesto se usacomó un intermediario sintético para la producción de pirogalol y ésteres de ácido gálico. Hoy en día el ácido gálico se usa principalmente para la síntesis de trimetoprim, así como para la producción de propilgalato, el cual se usa como agente antioxidante en grasas y aceites (Weetal., 1985). El ácido gálico actúa como agente antiapoptótico, y ayuda a las células humanas contra el daño oxidativo. También puede ser usado en la fabricación de tintas para escritura, y en el revelado de fotografías (Purohit *et al.*, 2006). El pirogalol (producto metabólico final del ácido gálico) también tiene diversas aplicaciones industriales para la tinción del

cuero, piel, y colorantes para cabello (Zeida *et al.*, 1998). La tanasa también se usa en la preparación de sondas analíticas para la determinación de estructuras de naturaleza de ésteres de ácido gálico que ocurren de manera natural, para detectar células cancerígenas, en el tratamiento del aceite oliva, y en la industria de la piel para tratar desechos efluentes con alto contenido de taninos (Belmares *et al.*, 2004, Noguchi *et al.*, 2007; Das Mohapatra *et al.*, 2009).

### 5.7. Fuentes de tanasa

Las tanasas se encuentran en vegetales ricos en taninos, principalmente en sus frutos, hojas, ramas y raíces (Madhavakrishna *et al.*, 1960; Pourrat, *et al.*, 1985; Lekha y Losane, 1997). Las TAH también se encuentran en animales, ya que puede ser extraída de la mucosa rumiante del intestino bovino (Begovic y Duzic, 1976). Se ha reportado que en algunos insectos se produce la enzima durante la etapa larvaria (Nierenstein, 1930). Sin embargo, las tanasas se obtienen principalmente de microorganismos ya que suelen ser más estables que sus análogas obtenidas de otras fuentes (Ayed y Hamdi, 2002; Nishitani y Osawa, 2003; Lekha y Losane, 1997). Además, los microorganismos pueden producir enzimas en grandes cantidades en forma constante y ser sometidos a técnicas de cultivo o bien a manipulación genética, dando como resultado un incremento en los títulos de actividad de esta enzima. Aunque se han descrito tanasas en algunas bacterias, tales como *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Klebsiella* (Deschamps *et al.*, 1983), *Streptococcus bovis* y *Selenomonas ruminantium* (Belmares *et al.*, 2004), los microorganismos más estudiados para la producción de tanasas son los hongos filamentosos, entre ellos se encuentran *Ascochyta*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Mucor*, *Myrothecium*, *Neurospora*, *Rhizopus*, *Tricothecium*, *Penicillium* (Lekha y Lonsane, 1997), *Fusarium* y *Trichoderma* (Bajpai y Patil, 1997). Hasta ahora, dos sistemas de fermentación son usados para la producción de tanasa que son la fermentación sumergida (SmF) y cultivo en soporte sólido (SSF). De todos estos hongos, el más estudiado y caracterizado es *Aspergillus niger* debido a que es el mejor productor de tanasa.

**Tabla I. Microorganismos productores de tanasa (adaptado de Bhat *et al.*, 1998)**

Microorganismo	Referencia
<b>Bacterias</b>	
** <i>Achromobacter sp</i>	Lewis & Starkey , 1969
<i>Bacillus pumilis</i>	Deschamps <i>et al.</i> , 1983
<i>Bacillus polymyxa</i>	Deschamps <i>et al.</i> , 1983
<i>Corynebacterium sp</i>	Deschamps <i>et al.</i> , 1983
<i>Klebsiella planticola</i>	Deschamps <i>et al.</i> , 1983
** <i>Pseudomonas solanacerarum</i>	Deschamps and Lebeault, 1984
** <i>Selenomonas ruminatium</i>	Skene & Brooker 1995
<b>Hongos</b>	
**** <i>Aspergillus oryzae</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
** <i>Aspergillus flavus</i>	Yamada <i>et al.</i> , 1968
**** <i>Aspergillus niger</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
**** <i>Aspergillus japonicas</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
** <i>Aspergillus aureus</i>	Bajpai & Patil., 1996
**** <i>Aspergillus awamori</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
** <i>Aspergillus fischeri</i>	Bajpai & Patil., 1996
** <i>Aspergillus rugulosus</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
** <i>Aspergillus terreus</i>	Bajpai & Patil., 1996
** <i>Penicillium chrysogenum</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
** <i>Penicillium notatum</i>	Ganga <i>et al.</i> , 1977
** <i>Penicillium islandicum</i>	Ganga <i>et al.</i> , 1977
** <i>Penicillium digitatum</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
** <i>Penicillium acrellanum</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
** <i>Penicillium caryophilum</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
** <i>Penicillium charlesii</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
** <i>Penicillium citrinum</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Farias <i>et al.</i> , 1992
<i>Fusarium solani</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
** <i>Fusarium oxysporium</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
<i>Rhizopus oryzae</i>	Hadi <i>et al.</i> , 1994
<i>Trichoderma viride</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
** <i>Trichoderma hamatum</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
** <i>Trichoderma harzianum</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
** <i>Helicostylum sp</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
** <i>Cunnighamella sp</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
** <i>Syncephalastrum racemosum</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
* <i>Neurospora crassa</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
<b>Levaduras</b>	
<i>Candida sp</i>	Aoki <i>et al.</i> , 1976
<i>Pichia sp</i>	Deschamps & Lebeault, 1984
** <i>Debaryomyces hansenii</i>	Deschamps & Lebeault, 1984

\*Pobre productor \*\*Productor moderado \*\*\*Buen productor \*\*\*\*Mejor productor

## 5.8. Producción de la tanasa

La tanasa puede ser extraída de fuentes microbianas, animales y vegetales, pero las más comúnmente usadas y las producidas industrialmente provienen de microorganismos, ya

que éstos producen tanasas más estables que las enzimas extraídas por fuentes animales o vegetales (Lekha y Lonsane *et al.*, 1997). A pesar de sus enormes usos y aplicaciones comerciales, las tanasas son comercializadas por pocas compañías. Una tanasa es comercializada por Biocon (India), Kikkoman (Japón), ASA specialenzyme GmbH (Alemania), JFC GmbH (Alemania ), Sigma-Aldrich Co. (USA), Wako Pure Chemical Industries, Ltd (Japón) y Novo Nordisk (Dinamarca) con diferentes unidades catalíticas en función de la presentación del producto. Las tanasas de Kikkoman y Biocon son producidos por cultivo en soporte sólido (SSC). ASA specialenzyme GmbH (Alemania) produce una tanasa de la levadura *Arxula adeninivorans*. (Aguilar *et al.*, 2007; Aguilar y Gutierrez-Sanchez., 2001)

### **5.9 Tanasa de *Aspergillus niger* GH1**

Recientemente, el grupo del Departamento de Investigación en Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila ha aislado hongos filamentosos de suelos y de material vegetal de la región semidesértica del estado de Coahuila (Mata-Gómez, *et al.*, 2009). Específicamente este grupo ha descrito a un hongo xerófito *Aspergillus niger* cepa GH1 como un excelente productor de tanasa (Cruz-Hernández *et al.*, 2005, Cruz-Hernández *et al.*, 2006). A partir de este hongo, se ha purificado y caracterizado una tanasa que presentó actividad máxima a pH 6 y a la temperatura a 60°C (Mata-Gómez *et al.*, 2009). Además, esta enzima presentó alta estabilidad a pH 6.0 y 5.5 con vidas medias de 632 y 607 horas, respectivamente. En el intervalo de pH de 3 a 5, la tanasa probó ser significativamente estable, mostrando una vida media de 131 a 172 horas. A las temperaturas 50, 60 y 70°C la vida media fue de 281, 25 y 4 minutos, respectivamente. De entre todas las tanasas descritas, la tanasa de *A. niger* GH1 ha mostrado tener la mayor actividad a condiciones extremas de pH y temperatura. Todas estas propiedades junto con su alta actividad específica (238 U/mg) y la alta afinidad que presenta hacia el ácido tánico, hacen a la tanasa de *A. niger* GH1 una candidata potencial para ser producida en grandes cantidades para su posterior uso en aplicaciones industriales (Mata-Gómez *et al.*, 2009).

### **5.10. *P. pastoris* como hospedero para la producción de proteínas recombinantes**

En los últimos años se ha incrementado el uso de *P. pastoris* en sistemas de expresión para producir proteínas recombinantes, gracias a una serie de características favorables que posee dicha levadura. Como microorganismo eucariote, *P. pastoris* ofrece muchas de las ventajas de los sistemas de expresión de los organismos superiores, ya que es capaz de realizar modificaciones postraduccionales y generalmente conduce al plegamiento correcto de las proteínas. Además, su manipulación con fines biotecnológicos es más sencilla y menos costosa que otros sistemas de expresión de eucariotes superiores y generalmente se obtienen niveles de expresión más altos que en estos últimos (Romanos, 1995; Escamilla *et al.*, 1999).

*P. pastoris* es una levadura metilotrófica que tiene la capacidad de crecer en metanol como única fuente de carbono y energía, el cual es metabolizado por una ruta metabólica que involucra a la enzima alcohol oxidasa (AOX), la cual se sintetiza en grandes cantidades (hasta el 35% de las proteínas celulares) cuando se cultiva en metanol como única fuente de carbono (Digan *et al.*, 1989).

Se han desarrollado sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes, en los cuales se introduce a *P. pastoris* un vector que porta el gen heterólogo bajo el control del promotor del gen *AOX1*, y por recombinación homóloga se integra a su genoma, siendo posible inducir la expresión de dicho gen heterólogo al emplear metanol como única fuente de carbono (Clare *et al.*, 1991).

Muchos de los vectores empleados para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* son vectores plasmídicos de integración que se caracterizan por tener un promotor y terminador de la transcripción del gen *AOX1* de *P. pastoris* (regiones 5'*AOX1* y 3'*AOX1* TT, respectivamente), y una secuencia señal tal como la del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* que favorece la secreción de la proteína recombinante al medio de cultivo.

A pesar de que se han producido altos niveles de proteínas recombinantes en cultivos de *P. pastoris* realizados en matraces agitados, generalmente los niveles de producción en este tipo de cultivos son bajos en comparación con los niveles obtenidos en biorreactores de tanque agitado. Esto es debido fundamentalmente a que sólo es posible crecer el organismo a elevadas densidades celulares (> 100 g/L peso seco ó 500

DO<sub>600</sub>) en el ambiente controlado de un biorreactor. Especialmente para el caso de proteínas secretadas al medio de cultivo, la concentración de producto recombinante en el medio es aproximadamente proporcional a la concentración de células en el cultivo. Por otro lado, el nivel de transcripción del gen heterólogo a través del promotor *AOX1* puede ser 3-5 veces mayor en células de *P. pastoris* alimentadas con metanol a velocidades limitantes en comparación con células cultivadas en presencia de exceso de metanol. Todas las cepas empleadas para la producción de proteínas heterólogas son derivadas de la cepa silvestre de *P. pastoris* NRRL Y-11430: GS115 (*his4*), KM71 (*aox1, his4*), PPF1 (*his4, arg4*), SMD1163 (*his4, pep4, prB1*), SMD1165 (*his4, prB1*), y SMD1168 (*his4, pep4*). La cepa GS115 ha sido usada por muchos investigadores, tiene un defecto en el gen de la histidinol deshidrogenasa (*his4*) lo cual le impide sintetizar histidina. Los plásmidos de expresión que contienen el gen *HIS4* complementan el *his4* del hospedero, de modo que las transformantes se seleccionan por su habilidad de crecer en un medio deficiente de histidina. La reversión espontánea de GS115 al prototipo His<sup>+</sup> ocurre con una frecuencia de 10<sup>-8</sup> (Cregg *et al.*, 1985).

La cepa KM71 se emplea para obtener fácilmente células recombinantes que tienen el gen *AOX1* no funcional, por lo que crecen lentamente en metanol como fuente de carbono y se les denomina Mut<sup>S</sup>. La cepa PPF1 se emplea cuando se necesita realizar la transformación con dos plásmidos, mientras que las cepas SMD1168, SMD1165 y SMD1163 tienen interrumpidos los genes que codifican para la proteasa A (*PEP4*) y/o proteasa B (*PRB1*), que en algunas proteínas ha ayudado a disminuir la degradación proteolítica y por lo tanto aumentar la producción (Cregg *et al.*, 1985).

### **5.11. Síntesis de tanasa en cepas recombinantes de *P. pastoris***

Hasta la fecha, sólo una tanasa proveniente de *A. oryzae* ha sido producida de forma recombinante en el sistema de expresión de *P. pastoris* (Yu *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2004) y todavía no se ha descrito su producción y comercialización a nivel industrial. Esta tanasa de *A. oryzae* ha sido producida en *P. pastoris* de manera extracelular (Zhong *et al.*, 2004) e intracelular (Yu *et al.*, 2008), resultando 7 U/mL después de 96 h de inducción para un cultivo en lote alimentado en un biorreactor de 3 L en el primer caso, y

0.96 U/mL después de 72 h de inducción en un cultivo a nivel matraz para el segundo caso, ambos realizados con una cepa Mut<sup>s</sup>, pero no se describieron las propiedades bioquímicas de esta tanasa recombinante, excepto por la formación de una estructura de doble cadena. Las propiedades bioquímicas de una tanasa de *A. oryzae* producida como recombinante en *P. pastoris* de doble cadenano han sido descritas hasta hace poco (Mizuno *et al.*, 2014). Estas propiedades bioquímicas fueron muy similares para la tanasa nativa y recombinante.

## 6. MÉTODOS

### 6.1. Cepas, plásmidos, composición de medios, reactivos químicos y enzimas

El trabajo experimental se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología Molecular (L5) perteneciente al Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.

La cepa KM71 de *Pichia pastoris* (his4), el kit de transformación *Pichia* EasyComp y el plásmido pPIC9 fueron comprados en Invitrogen Corporation (*San Diego Ca, EUA*). Los oligonucleótidos se adquirieron de Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville IA). La cepa JM109 de *Escherichia coli* usada como hospedero de clonación y subclonación se obtuvieron de Promega (Madison, WI). La cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* usada como hospedero de clonación pertenece al cepario del laboratorio 5 del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. El plásmido pUC57 usado para la clonación del gen artificial fue obtenido de GenScript Corp. (Piscataway, NJ). El medio Luria Bertani (LB), las placas con medio LB y agar, el medio de Regeneración base de dextrosa (RDB), el medio de extracto de levadura y peptona (YPD), el medio mínimo amortiguado con glicerol (BMG) y el medio mínimo amortiguado con metanol (BMM) se prepararon de acuerdo al manual del kit de expresión de *P. pastoris* (Invitrogen). Para la inducción, el medio BMM fue suplementado con metanol 0.75%. La base nitrogenada de levaduras (YNB) sin aminoácidos fue comprada en Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO). La GoTaq DNA polimerasa, la endonucleasa de restricción *SalI*, la T4 DNA ligasa, el marcador de tamaño molecular Benchtop 1 Kb DNA Ladder, el kit para aislamiento de DNA plasmídico Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification system y el kit de purificación de fragmentos Wizard® SV gel and PCR Clean Up System se compraron en Promega (Madison, WI). Las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Avr*II y la glicosidasa endo H<sub>f</sub> fueron de New England Biolabs (Beberly, MA). El marcador de



tamaño molecular HyperLadder I se obtuvo de Bioline (Taunton, MA). Todos los reactivos químicos fueron de grado analítico y comprados en Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO) o de productos químicos Monterrey (Monterrey, N.L., México). Los medios de cultivo provienen de Difco (Detroit, MI, EUA) y Becton Dickinson de México, S.A. de C.V. (*Edo. de México, Méx.*). El estuche de "Geneclean" se adquirió de Promega. El sistema de expresión de *P. pastoris* se adquirió de Invitrogen Corporation (*San Diego Ca, EUA*). El DNA genómico de *A. niger* GH1 perteneciente a una zona semidesértica del Estado de Coahuila fue donado por el grupo de investigación del Dr. Cristóbal Noé Aguilar González (Laboratorio de Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, México).

## 6.2. Equipo

Los equipos utilizados para el desarrollo de este trabajo se describen a continuación: una centrífuga J2-21 M (*Beckman*), campana microbiológica de flujo laminar (*labconco Co. Inc.*), potenciómetro (*Beckman*), estufa (*131 Felisa*), 3 refrigeradores (*Torrey*), balanza granataria (*WM Ainsworth And Sons Inc.*), balanza analítica (*AMD*), placa calentadora con agitación (*Termolyne*), placa de agitación (*Termolyne*), agitador magnético (*PC103 Corning*), bomba de vacío (*0322-V4B-G180X General Electric*), olla de presión 21 litros (*Presto*), gradillas (*Glasser*), baño de agua (*Precisión, Termo EC*), termociclador para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (*LABNET*), campana para PCR (*CBS, CBP-048*), equipo de captura de imágenes (*EDAS 40 kodak*), congelador a -20°C (*Torrey*), cámara de electroforesis horizontal y fuente de poder (*494 ISCO*), microcentrífuga (*Beckman Coulter TM22R*), agitadores magnéticos (*Thermoline*), cámara de electroforesis vertical (*Termo EC*), placa de calentamiento 17600 modelo DB17615 (*Thermoline*), espectrofotómetro modelo SmartSpect<sup>TM</sup> 3000 (*Bio-Rad*), micropipetas (*Labnet Co.*), centrífuga Allegra<sup>TM</sup> 21R (*Beckman Coulter*), concentrador a vacío (*Labconco Corporation*), autoclave (*Aesa*), balanza granataria (*Mettler, Toledo*), mini vortex (*VWRbrand 58816-121*), cubetas desechables de poliestireno (*Plastibrand*), incubadora (*Yamato*), filtros para ultrafiltración de muestras biológicas de 0.05-0.5 mL (*Millipore*), espectrofotómetro DU-650 región ultravioleta-visible (*Beckman Coulter*), una incubadora con agitación (*Lab-Line Instruments Inc.*). Para el análisis de proteínas

se utilizó un equipo de electroforesis equipado con una fuente de poder (*Termo EC570-90*), jeringa para descarga capacidad 50 µL para geles de poliacrilamida, (*Hamilton*), sistema de análisis de imagen (*Kodak EDAS-290*) plataforma de lavado (*VWR Scientific Products*), cámara de electroforesis de proteínas, cristales de 10 x 10 cm. Para el procesamiento de datos y esquemas gráficos se empleó una computadora COMPAQ PRESARIO V3417LA (*Compaq*), el procesador de texto Microsoft Word XP (*Microsoft Corporation, 2002*), el procesador de gráficos Microsoft Power Point XP (*Microsoft Corporation, 2002*) y la hoja de cálculo Microsoft Excel XP (*Microsoft Corporation, 2002*). Las bases de datos y programas computacionales de biología molecular empleados fueron: GenBank del NCBI (*National Center of Biotechnology Information, Bethesda MD, USA*), BioEdit, NEBcutter, BRENDA, Blast, Clustal Omega y Phyre<sup>2</sup>.

### 6.3. Estrategia general

Para determinar la secuencia nucleotídica que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1, se sintetizó la secuencia codificante de la tanasa de *A. niger* GH1 mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando como molde el DNA genómico de *A. niger* GH1 y oligonucleótidos dirigidos hacia el inicio y al final de la secuencia que codifica para la proteína madura. El producto amplificado se ligó en el vector de clonación pGEM y se transformaron células de *E. coli* calciocompetentes. Cinco plásmidos provenientes de diferentes colonias de *E. coli* se secuenciaron en el Instituto de Fisiología Celular (UNAM), usando los oligonucleótidos T7 y SP6. Cuatro de estos plásmidos se secuenciaron nuevamente empleando oligonucleótidos internos diseñados en base a la secuencia nucleotídica obtenida con los oligonucleótidos T7 y SP6. Por último, se determinó la secuencia nucleotídica consenso a partir de las 18 secuencias nucleotídicas obtenidas. Esta secuencia y la secuencia aminoacídica deducida se compararon con las secuencias reportadas de las bases de datos. Adicionalmente se hizo un análisis de dominios funcionales de la tanasa de *A. niger* GH1 y se construyó un modelo molecular con el que se analizaron aspectos estructurales y funcionales de la tanasa de *A. niger* GH1.

Para la construcción de cepas recombinantes de *P. pastoris* KM71 productoras de la tanasa de *A. niger* GH1, se diseñó un gen artificial (*ANTgs*) que codifica para la tanasa

de *A. niger* GH1 mediante el uso de codones preferenciales de *P. pastoris* y la inclusión de la secuencia prepro del factor alfa de *Sacharomyces cerevisiae*. El gen artificial fue sintetizado, clonado en el vector pUC57 y subclonado en los vectores pGEM y pPIC9 para obtener el plásmido pPIC9ANTgs. Se linearizó el plásmido pPIC9ANTgs construido y se transformó la cepa KM71 de *P. pastoris* mediante electroporación. De las cepas construídas se caracterizaron su genotipo (*aox1y ANT<sup>+</sup>*) mediante PCR y su fenotipo mediante la evaluación de la expresión de la secuencia clonada en cultivos a nivel matraz, a través de la actividad enzimática extracelular de tanasa.

Con el fin de realizar una caracterización bioquímica de la enzima producida, con una preparación enzimática obtenida por ultrafiltración del medio de cultivo libre de células de los cultivos en matraz, se determinó la presencia de posibles N-glicosilaciones evaluando el cambio en la migración en geles de poliacrilamida de muestras tratadas y sin tratar con endo H<sub>f</sub> y además se determinó la presencia de una posible estructura bicatenaria de la tanasa producida. Se evaluó el efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática de tanasa, la estabilidad de la enzima a 4 y 30°C, la actividad específica y los parámetros cinéticos Km y Vmax. En la Figura 3 se muestra un esquema de la estrategia general experimental que se realizó en este trabajo.

En la Tabla II (A, B y C) se muestran los oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo en cada una de las etapas: A. Determinación de la secuencia nucleotídica de la tanasa de *A. niger* GH1. B: Síntesis del gen sintético a partir del vector pPUC57ANTgs. C: Determinación del genotipo Mut<sup>s</sup> y ANT<sup>+</sup> en las cepas de *P. pastoris*.

**Tabla II. Oligonucleótidos empleados en el presente trabajo**

II). A. Determinación de la secuencia nucleotídica de la tanasa de *A. niger* GH1.

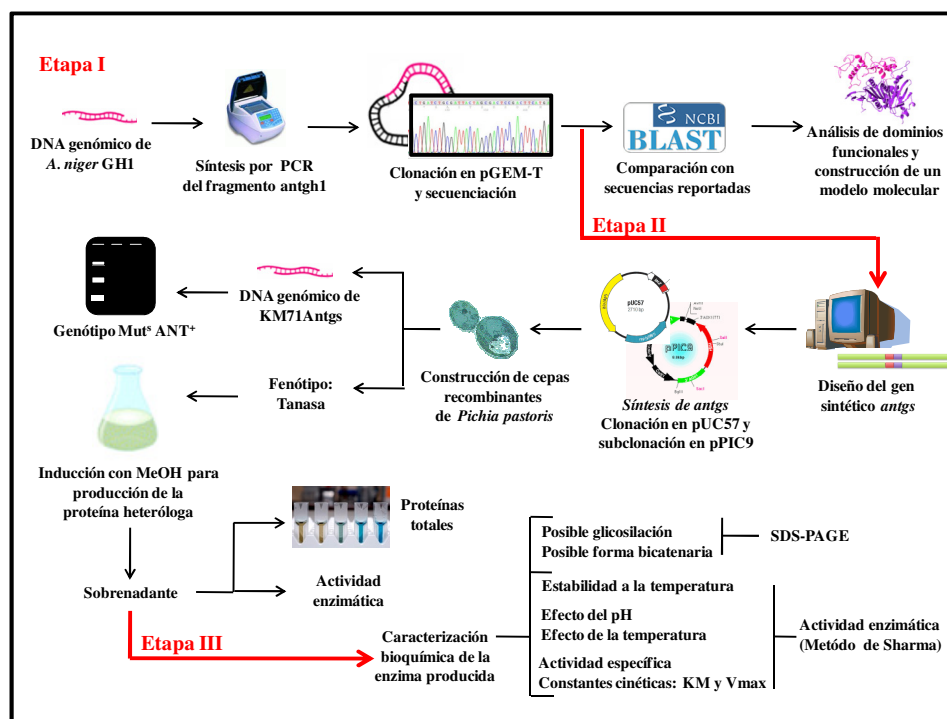
Nombre	Secuencia
5'TanX	5'-GCC CTC GAG AAA AGA ACT TCC CTG TCC GAT CTC-3'
3'TanAV	5'-ATT CCT AGG TTA AAA AAC GGG CAT CTT GAA-3'
5'TanC1	5'-CGT GAA GAC CGT CGT AGA TG-3'
3'TanC2	5'-CAC GTC TTC CCT GCC ACT AT-3'

II). B. Síntesis del gen sintético a partir del vector pPUC57ANTgs.

Nombre	Secuencia
5'TANGSA	5'-TGG CCT AGG TTA GAA AAC TG-3'
3'ALFAGSB	5'-GAA GGA TCC AAA CGA TGA GA-3'

## II). C. Determinación del genotipo *aox1* y *ANT*<sup>+</sup> en las clonas de *P. pastoris*

Nombre	Secuencia
5'AOX	5'-GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC-3'
3'AOX	5'-GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC-3'



**Figura 3. Representación esquemática de la estrategia general.** Se muestran cada una de las etapas realizadas para la construcción de las cepas recombinantes de *P. pastoris* KM71 portadoras del fragmento *ANTgs* que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1 y caracterización de la enzima producida.

## 6.4. Determinación de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la tanasa nativa de *A. niger* GH1

### 6.4.1. Obtención del DNA genómico de *A. niger* GH1

El DNA genómico de *A. niger* GH1 proveniente de una región semidesértica del estado de Coahuila fue proporcionado por el grupo de trabajo del Dr. Cristóbal Aguilar del Laboratorio de Alimentos, Universidad Autónoma de Coahuila, el cual fue empleado como secuencia blanco para realizar la síntesis del fragmento de la región nucleotídica codificante de la tanasa de *A. niger*GH1. De la preparación de DNA obtenida (concentración de la preparación: 250 ng/μL), se realizó una dilución 1:10 y se utilizó

para realizar síntesis por PCR de la secuencia que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1.

#### 6.4.2. Síntesis por PCR dela secuencia que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1

La secuencia que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1 (*ANTGHI*) se sintetizó por PCR empleando iniciadores diseñados a partir de la secuencia nucleotídica de la tanasa de *A. niger* CBS 513.88 (GenBank número de acceso XP\_001402486.1) y dirigidos al inicio y final de la secuencia que codifica para la proteína madura: 5'TanX (5'-GCC CTC GAG AAA AGA ACT TCC CTG TCC GAT CTC-3')y 3'TanAV (5'-ATT CCT AGG TTA AAA AAC GGG CAT CTT GAA-3'). Se utilizó como molde la preparación del DNA genómico descrita en la sección 6.4.1. Inicialmente se probaron los iniciadores en la estandarización de la PCR, empleando la enzima *GoTaq* DNA polimerasa de Promega Corporation (Promega Num. Cat. M3005). Se varió principalmente la temperatura y el tiempo de la etapa de hibridación. En la Tabla III se muestra la composición de los reactivos usados para la PCR estandarizada.

**Tabla III.** Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR estandarizada con *GoTaq* DNA polimerasa para síntesis de la secuencia que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final
Green Buffer (5X)	5.0	1X
dNTP's (10 mM)	0.5	0.2 mM
Iniciador 5'TanX (5μM)	2.5	0.5 μM
Iniciador 3'TanAV (5μM)	2.5	0.5 μM
<i>GoTaq</i> DNA Polimerasa (5 U/μL)	0.2	0.04 U/μL
DNA molde (25 ng/μL)*	1.0	1.0 ng/μL
Agua ultrapura	13.3	-----
Volumen final	25.0	-----

\* La muestra proviene de un Stock que tiene 250 ng/μL y diluída 1:10, resultando una concentración de 25 ng/μL.

El programa que se empleó para la amplificación del fragmento se muestra en la Tabla IV. Una alicuota de 5 μL de la reacción de PCR fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer de Tris-boratos-EDTA 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido

bórico 89 mM, EDTA 2 mM) en paralelo con el marcador de tamaño molecular HyperLadder I para verificar la presencia de las bandas de interés, teñidos luego con GelRed Nucleic Acid Stain (concentración final 100X diluido en cloruro de sodio 100 mM) y analizados a través del sistema de toma de imagen Kodak EDAS-290.

**Tabla IV.** Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para verificar la amplificación de la secuencia que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1 con GoTaq DNA polimerasa.

<b>Etapas</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>°C</b>	<b>Tiempo</b>
1	1	Desnaturalización	94	1 min
2	30	Desnaturalización Hibridación Extensión	94 55 72	1 min 30 s 1 min, 45 s
3	1	Extensión final	72	10 min
4	1	Refrigeración final	4	Indefinido

#### 6.4.3. Clonación de la secuencia que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1

El primer paso para llevar a cabo la clonación del producto de PCR en un vector de clonación fue la ligación de dicho producto con el vector de clonación pGEM. En la Tabla V se muestra la mezcla de reacción para la ligación del producto amplificado con el vector de clonación pGEM-T.

**Tabla V.** Mezcla de reacción de ligación del producto amplificado con el vector pGEM-T

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (μL)</b>
Buffer de Ligación Rápida (2X)	5.0
pGEM (50 ng/μL)	1.0
DNA T4 Ligasa (3 U/μL)*	1.0
Producto amplificado	3.0
Agua	0.0
Volumen final	10.0

\*Unidades Weiss

Con el producto de la reacción de ligación, se llevó a cabo la transformación de células *E. coli* DH5α químicamente competentes, para lo que se realizó el siguiente

procedimiento: a 50  $\mu$ L de células se le agregaron 2.0  $\mu$ L de la mezcla de reacción de ligación con el vector pGEM (Tabla V). La suspensión celular se mezcló suavemente, esta mezcla se incubó en hielo por 10 min, luego se sometió a un choque térmico de 42°C por 45 s y se transfirió inmediatamente a hielo por 2 min. A continuación a esta suspensión celular se le agregaron 250  $\mu$ L de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM y glucosa 20 mM) y se incubó durante una 1 h a 37°C y 250 rpm. Por último, 100  $\mu$ L de la suspensión celular se sembraron en placas de LB con ampicilina (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, ampicilina 100  $\mu$ g/mL y agar 15 g/L) más 100  $\mu$ L de IPTG (IPTG 10 mM, Sigma Num. Cat I-5502) y 40  $\mu$ L de X-Gal (50 mg/mL, Promega, Num. Cat. V394A), para la selección de cepas recombinantes de *E. coli* portadoras del plásmido pGEMANTGHI (colonias blancas). Las placas se incubaron en una incubadora estática a 37°C de 16-24 h.

#### **6.4.4. Caracterización del plásmido construido pGEMANTGHI**

##### **6.4.4.1. Preparación del DNA plasmídico de pGEMANTGHI**

Al final de la incubación y aparición de colonias transformadas (blancas), se aislaron las cepas transformadas, se inocularon en caldo LB suplementado con ampicilina (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, ampicilina 100  $\mu$ g/mL), y se incubaron a 37°C con una agitación de 250 rpm durante 14-18 h para su propagación y luego obtener el DNA plasmídico (DNAP) necesario para su caracterización. Para llevar a cabo el procedimiento de extracción se utilizó el sistema de purificación de DNA Wizard (Wizard Plus SV Minipreps, Promega Num. Cat. A1330) el cual está diseñado para purificar DNA plasmídico mediante el método de lisis alcalina y purificación en una membrana. La extracción de DNA plasmídico a pequeña escala (miniprep) se realizó a partir de 2 mL de cada cultivo de las cepas transformantes crecidas en medio LB con ampicilina. Cada paquete celular se obtuvo por centrifugación a 8000 rpm por 5 min, el sobrenadante se decantó y el paquete celular se resuspendió con la solución de resuspensión presente en el kit (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, RNasa A 100  $\mu$ g/mL). Posteriormente se añadieron 250  $\mu$ L de solución de lisis celular (NaOH 200 mM, SDS 1%) y la mezcla se agitó 4 veces por inversión para lograr un mezclado

adecuado. Se añadieron 10  $\mu$ L de solución alcalina de proteasas, se agitó la mezcla por inversión 4 veces y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Transcurrido este tiempo, se añadieron 350  $\mu$ L de solución neutralizante (hidrocloruro de guanidina 4.09 M, acetato de potasio 759 mM, ácido acético glacial 2.12 M, pH 4.2). La mezcla se agitó 4 veces y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente en una microcentrifuga Beckman 22R. El sobrenadante se decantó en una de las columnas del sistema Wizard Plus SV DNA y se centrifugó a 13000 rpm por 1 min a temperatura ambiente. Enseguida se añadieron 750  $\mu$ L de solución de lavado (acetato de potasio 60 mM, Tris-HCl 8.3 mM pH 7.5, EDTA 0.04 mM pH 8.0, etanol 60%), se centrifugó a 13000 rpm por 1 min y se repitió una vez más la centrifugación con 250  $\mu$ L de la solución de lavado a 13000 rpm por 2 min a temperatura ambiente. Enseguida la columna se transfirió a un tubo nuevo y estéril de 1.5 mL y se centrifugó a 13000 rpm por 1 min, luego se añadieron 100  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y se centrifugó a una velocidad de 13000 rpm por 1 min a temperatura ambiente. De la preparación recuperada, se analizaron 5  $\mu$ L en un gel de agarosa al 0.8% y tinción con GelRed Nucleic Acid Stain (concentración final 100X diluido en cloruro de sodio 100 mM). El resto de la preparación obtenida se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

#### **6.4.4.2. Caracterización del plásmido pGEMANTGH1 por PCR**

La caracterización del plásmido pGEMANTGH1 se llevó a cabo por PCR utilizando los iniciadores específicos para la región de tanasa (5'TanX y 3'TanAV) y el protocolo estandarizado con la enzima GoTaq Polimerasa (Tabla VI), en donde se esperaba la amplificación de una banda de alrededor de 1700 pb, según la secuencia de la tanasa de *A. niger* CBS 513.88, correspondiente a la secuencia codificante de la tanasa de *A. niger* GH1. Las cepas conteniendo el plásmido que dieron positiva la PCR se conservaron en LB suplementado con glicerol (concentración final de glicerol 50%) y se almacenaron a -20°C hasta su uso. La mezcla de reacción se muestra en la siguiente tabla.



**Tabla VI.** Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR estandarizada con *GoTaq* DNA polimerasa para la caracterización de *pGEMANTGHI*

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final
Green Buffer (5X)	5.0	1X
dNTP's (10 mM)	0.5	0.2 mM
Iniciador 5'TanX (5 μM)	2.5	0.5 μM
Iniciador 3'TanAV (5 μM)	2.5	0.5 μM
<i>GoTaq</i> DNA Polimerasa (5 U/μL)	0.2	0.04 U/μL
<i>pGEMANTGHI</i> (1.37 ng/μL)*	1.0	0.05 ng/μL
Agua ultrapura	13.3	-----
Volumen final	25.0	-----

\* La muestra proviene de un Stock que tiene 137.78 ng/μL diluída 1:100 resultando una concentración de 1.37 ng/μL.

El programa para la PCR que se empleó para la confirmación de la inserción del fragmento *ANTGHI* en *pGEM* fue el mismo que el empleado para la amplificación del fragmento *ANTGHI* a partir del DNA genómico de *A. niger* GH1 (Tabla IV). Una alícuota de 5 μL de cada reacción de PCR fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer de Tris-boratos-EDTA (TBE 1X; Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM), teñidos luego con GelRed Nucleic Acid Stain (concentración final 100X diluido en cloruro de sodio 100 mM) y analizados a través del sistema de toma de imagen Kodak EDAS-290.

#### **6.4.5. Determinación de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la tanasa de *A. niger* GH1**

##### **6.4.5.1. Secuenciación parcial del fragmento *ANTGHI***

Para la secuenciación parcial del fragmento *ANTGHI*, se emplearon 20 μL de *pGEMANTGHI* a una concentración aproximada de 200 ng/μL. Cinco plásmidos provenientes de diferentes colonias de *E. coli* se enviaron a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) para su secuenciación utilizando los iniciadores universales T7, y SP6 de *pGEM*. Con las secuencias obtenidas se determinó la secuencia consenso de las secuencias T7 y SP6, las cuales se utilizaron para el diseño de oligonucleótidos centrales

(sección 6.4.5.2.) para poder obtener la secuencia completa de la tanasa de *A. niger* GH1 (sección 6.4.5.2.). Para su interpretación, el servicio de secuenciación proporcionó los electroferogramas correspondientes y se determinaron las secuencias consenso con la ayuda del programa *BioEdit* (Hall, 1999).

#### **6.4.5.2. Secuenciación de la región central de la secuencia que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1**

De las secuencias nucleotídicas consenso que se obtuvieron previamente (sección 6.4.5.1. y 6.4.5.2), se seleccionó una region para el diseño de iniciadores centrales (5'TanC1 y 3'TanC2) para amplificar la sección correspondiente a la región nucleotídica central faltante que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1 (Figura 4). Entre los elementos importantes para el diseño de los iniciadores, el oligonucleótido 5' se diseñó con las siguientes condiciones:

- 1) Que parte de su secuencia fuera complementaria al extremo 3' de la secuencia nucleotídica parcial del extremo 5' del gen de la tanasa de *A. niger* GH1.
- 2) Que amplificara la región central de la secuencia nucleotídica de la tanasa.

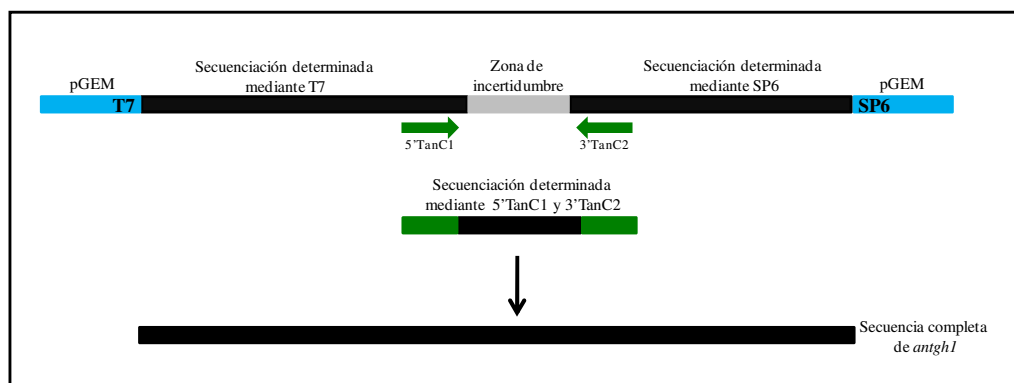
Así mismo para el diseño del oligonucleótido 3', se tomaron las siguientes condiciones:

- 1) Que parte de su secuencia fuera complementaria al extremo 5' de la secuencia nucleotídica parcial del extremo 3' del gen que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1.
- 2) Que amplificara la región central de la secuencia nucleotídica de la tanasa.

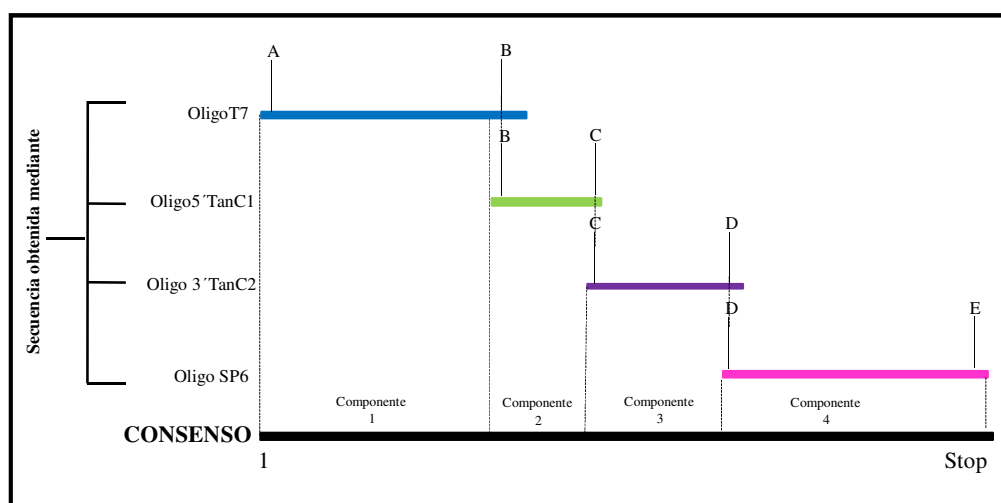
Los oligonucleótidos iniciadores diseñados se verificaron mediante el programa computacional, PRIMER BLAST usando como información de entrada la secuencia parcial que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1 y la secuencia de los iniciadores diseñados. Una vez realizado el diseño de los iniciadores y con el fin de poder finalizar la caracterización de la secuencia completa de la tanasa de *A. niger* GH1 y comprobar el correcto diseño de los oligonucleótidos, se realizó la amplificación del fragmento central por PCR. La reacción de PCR se realizó de manera similar como se muestra en la Tabla III utilizando los iniciadores específicos para la región central de tanasa (5'TanC1 y

3'TanC2). El programa para la PCR que se empleó para la amplificación de la región central faltante de la inserción del fragmento *ANTGH1* en pGEM con la *GoTaq* DNA polimerasa fue el mismo que el mostrado en la Tabla IV en donde se esperaba la amplificación de una banda de alrededor de 300 pb según la secuencia de la tanasa de *A. niger* CBS 513.88, correspondiente a la secuencia codificante de la tanasa de *A. niger* GH1 central faltante. Una alícuota de 5 µL de cada reacción de PCR fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer de Tris-boratos-EDTA (TBE 1X; Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM), teñidos luego con GelRed Nucleic Acid Stain (concentración final 100X diluido en cloruro de sodio 100 mM) y analizados a través del sistema de toma de imagen Kodak EDAS-290. La secuenciación del fragmento central faltante de *ANTGH1* se llevó a cabo a partir de cuatro plásmidos provenientes de diferentes colonias de *E. coli* utilizando los oligonucleótidos de la región central de tanasa (5'TanC1 y 3'TanC2) y la metodología descrita en el punto 5.4.5.2. Con las secuencias centrales obtenidas con los oligonucleótidos 5'TanC1 y 3'TanC2, y las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos T7 y SP6, se realizó un alineamiento completo mediante el módulo Contig Assembly Program (CAP) de *BioEdit* (Hall, 1999) obteniéndose una secuencia consenso y por lo tanto se obtuvo la secuencia nucleotídica completa que codifica para la tanasa madura de *A. niger* GH1. En la figura 5 se representa el esquema de traslapamiento de secuencias obtenido mediante el módulo CAP de *BioEdit* para la obtención de la secuencia nucleotídica completa de la tanasa madura de *A. niger* GH1.

La secuencia nucleotídica y la secuencia aminoacídica deducida se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos GenBank mediante las herramientas BLAST del NCBI y se determinaron los porcentajes de identidad con otras tanasas fúngicas mediante el programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).



**Figura 4.** Esquema del diseño de oligonucleótidos centrales para la secuenciación completa de la secuencia que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1 (*ANTGHI*).



**Figura 5.** Determinación de la secuencia nucleotídica completa de la secuencia que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1 (*ANTGHI*) mediante el traslape de secuencias por el módulo CAP de BioEdit.

#### 6.4.6. Análisis computacional de la secuencia aminoacídica de la tanasa de *A. niger* GH1

Con la secuencia aminoacídica de la tanasa de *A. niger* GH1, se realizó un análisis de dominios funcionales por comparación de la secuencia aminoacídica obtenida con la base de datos de familias de proteínas Pfam. Se determinó la familia a la que pertenece la secuencia aminoacídica de la tanasa de *A. niger* GH1, y su arquitectura de organización de dominios. Mediante el uso del servidor *Phyre*<sup>2</sup> se realizó un modelo molecular de la estructura tridimensional de la tanasa de *A. niger* GH1. Con la ayuda del servidor NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) (Gupta *et al.*, 2004), se predijeron los posibles sitios de N-glicosilación. Este programa busca la secuencia

*asparagina-Xaa-serina* o *treonina* (donde Xaa puede ser cualquier aminoácido excepto prolina). Esta secuencia en particular es susceptible a ser N-glicosilada en células eucariotes, en el nitrógeno de la asparagina. Con el programa Swiss-PdbViewer/DeepView 4.1, se ubicaron en la estructura tridimensional los enlaces disulfuro, los sitios Kex2, y los sitios potenciales de N-glicosilación.

El sistema que se empleó para la identificación de la posición de un residuo en la secuencia de la tanasa nativa y recombinante de *A. niger* GH1 correspondió a la metionina del péptido señal nativo como el primer residuo de aminoácido. Por lo tanto el primer residuo de la tanasa nativa y recombinante de *A. niger* GH1 comenzó en la posición 20.

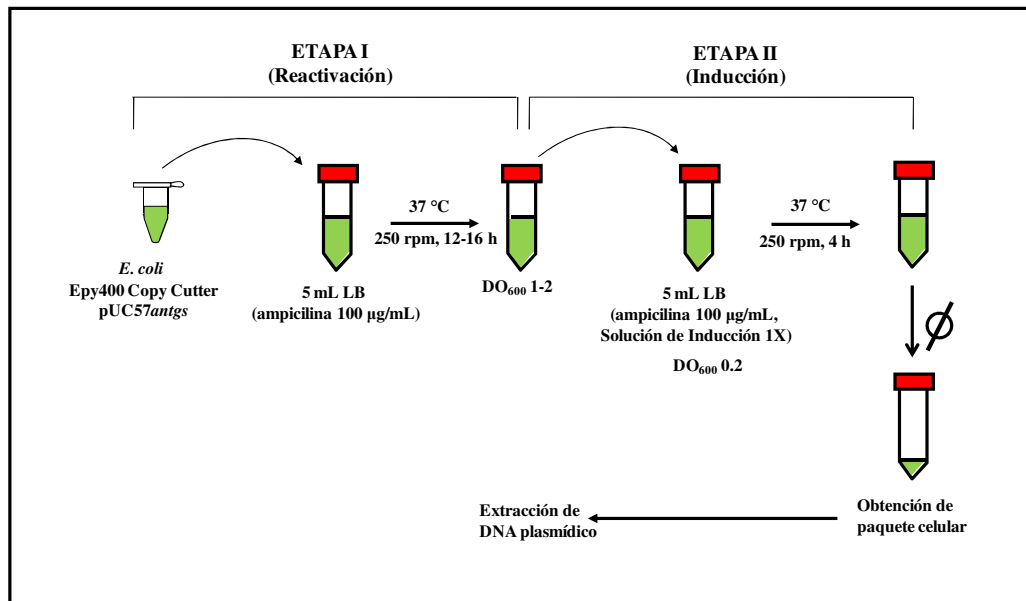
#### **6.5. Diseño y construcción de un gen sintético (*ANTgs*) que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1**

El gen *ANTgs* se diseñó en base a la secuencia aminoacídica de la tanasa de *A. niger* GH1 y optimizada para el uso de codones preferenciales de *P. pastoris* (Sreekrishna *et al.*, 1997). Así mismo, se introdujeron los sitios *Bam*HI y *Avr*II en los extremos 5'y 3'del gen *ANTgs*, respectivamente. Finalmente, se removieron secuencias ricas en adeninas y timinas introduciendo mutaciones silenciosas sin alterar la secuencia aminoacídica de la tanasa de *A. niger* GH1. La secuencia nucleotídica diseñada del gen *ANTgs* de 1961 pb fue sintetizada por la compañía *GenScript Co.* (Piscataway, NJ). Además, el gen fue clonado en el vector pUC57 generando el plásmido pUC57*ANTgs* y secuenciado. La compañía *GenScript Co.* proporcionó 4 µg del plásmido pUC57*ANTgs* liofilizado y los archivos electrónicos de la secuenciación del gen *ANTgs*. Posteriormente, el DNAp se resuspendió en 20 µL de agua libre de nucleasas, se incubó a 50°C por 15 min para disolver el DNA plasmídico y se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

## **6.6. Clonación del gen sintético que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1 en un vector del sistema de expresión de *P. pastoris***

### **6.6.1. Inducción de células de *E. coli* CopyCutter EPI400 para generar alto número de copias de plásmido**

La compañía *GenScript Co.* además del gen sintético clonado en pUC57 y liofilizado (*ANTgs*) proporcionó células de *E. coli* transformadas con dicho plásmido y provisto además de un inductor para generar un alto número de copias del plásmido. La preparación del inóculo para el proceso de inducción de alto número de copias se realizaron 2 etapas. La etapa I (reactivación) se llevó a cabo de la siguiente manera: en un tubo de 15 mL (Corning Cat. No. 430790) con 5 mL de LB (Bactotripton 1%, extracto de levadura 0.5%, cloruro de sodio 1%, ampicilina 100µg/mL) se inocularon con 10 µL de la conserva (*E. coli* EPICENTRE pUC57*ant*), y se incubó toda la noche a 37°C y 250 rpm. Transcurrida esta etapa, se realizó la etapa II (inducción). En la etapa de inducción de alto número de copias es crucial la agitación vigorosa para la mejor inducción posible del número de copias ya que la aereación es muy importante, por lo que el subcultivo se llevó a cabo en un tubo cónico de 50 mL (Corning Cat. No. 430829) conteniendo 5 mL de medio LB suplementado con ampicilina a una concentración en el medio de cultivo de 100 µg/mL e inductor (solución de inducción CopyCutter concentración final 1X) a una DO<sub>600</sub> inicial de 0.2, y se incubó a 37°C por 4 h con agitación vigorosa (250 rpm). (ver Figura 6). Terminado este tiempo, se obtuvo el paquete celular de 4 mL de medio de cultivo y se realizó la extracción de su DNA plasmídico utilizando la metodología descrita en la sección 6.4.4.1.



**Figura 6. Representación esquemática de la inducción de células de *E. coli* CopyCutter EPI400 para generar alto número de copias del plásmido pUC57ANTgs**

### 6.6.2. Diseño de oligonucleótidos para facilitar la síntesis por PCR y clonación del fragmento *ANTgs* en un vector de clonación

Una vez obtenida la secuencia nucleotídica correspondiente al gen sintético codificante para la tanasa de *A. niger* GH1 (sección 6.5.), se seleccionó una región para el diseño de los iniciadores (5'ALFAGSB y 3'TANGSA) para amplificar la sección correspondiente a la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido preprodel factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae* y la tanasa de *A. niger* GH1. Entre los elementos importantes para el diseño de iniciadores, el oligonucleótido 5' se diseñó con las siguientes condiciones:

- 1) Que parte de su secuencia fuera complementaria al inicio de la secuencia optimizada que codifica para el péptido preprodel factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae*.
- 2) Que contara con el sitio de restricción *Bam*HI, requerido para la adecuada clonación posterior del producto amplificado en el vector pPIC9.

Así mismo para el diseño del oligonucleótido 3', se tomaron las siguientes condiciones:

- 1) Que parte de su secuencia fuera complementaria al extremo 3' de la secuencia nucleotídica del gen artificial que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1.

- 2) Que contara con la secuencia complementaria reversa de un codón de término, y el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *AvrII*, requerido para la adecuada clonación posterior del producto amplificado en el vector pPIC9.

Los oligonucleótidos iniciadores diseñados se verificaron mediante la plataforma *Primer Blast* empleando como información de entrada la secuencia del gen artificial que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1 como blanco y la secuencia de los iniciadores diseñados. Una vez realizado el diseño de los iniciadores y con el fin de poder comprobar el correcto diseño de los oligonucleótidos se realizó la amplificación del fragmento por PCR.

### **6.6.3. Síntesis por PCR del framento *ANTgs***

El fragmento *ANTgs* se amplificó empleando los iniciadores previamente diseñados (Sección 6.6.2), y sintetizados por IDT Technologies: 5'ALFAGSB: (5'-GAA GGA TCC AAA CGA TGA GA- 3') y 3'TANGSA (5'-TGG CCT AGG TTA GAA AAC TG- 3'). Se utilizó como molde la preparación del DNA plasmídico obtenido a partir del paquete celular del cultivo de *E. coli* EPI400 (sección 6.6.1.). Se amplificó con la enzima *PfuUltra II Fusion HS* DNA polimerasa (Tabla VII y Tabla VIII) de Agilent (Agilent Cat. No. BM600670) tomando en cuenta las especificaciones del fabricante. Esta enzima se empleó por su alta fidelidad, debido a que incorpora un número menor de nucleótidos erróneos al producto amplificado que otras DNA polimerasas, aspecto importante para la clonación de productos de PCR. Se varió principalmente la temperatura y el tiempo de la etapa de hibridación. En la Tabla VII se muestra la composición de los reactivos usados para la PCR estandarizada.

El programa que se empleó para la amplificación de *ANTgs* con *Pfu* DNA polimerasa de Agilent se muestra en la Tabla VIII. Una alícuota de 5 µL de cada reacción de PCR fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer de Tris-boratos-EDTA (TBE 1X; Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM), teñido luego con GelRed Nucleic Acid Stain (concentración final 100X diluido en cloruro de sodio 100 mM) y analizado a través del sistema de toma de imagen Kodak EDAS-290.



**Tabla VII.** Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR con *Pfu* Ultra II DNA polimerasa para la amplificación del fragmento *ANTgs*

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final
Buffer Ultra II (10X)	2.5	1X
dNTP's (10 mM)	0.6	0.24 mM
Iniciador 5'ALFAGSB (5 μM)	2.5	0.5 μM
Iniciador 3'TANGSA (5 μM)	2.5	0.5 μM
<i>Pfu</i> DNA Polimerasa (1 U/μL)	0.5	0.02 U/μL
DNA molde (0.817 ng/μL)*	1.0	0.03 ng/μL
Agua ultrapura	14.4	----
Volumen final	25.0	----

\* La muestra proviene de un stock que tiene 81.7 ng/μL diluída 1:100, resultando una concentración de 0.817 ng/μL.

**Tabla VIII.** Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para verificar la amplificación del fragmento *ANTgs* con *Pfu* Ultra II DNA polimerasa.

Etapa	Ciclos	Temperatura	°C	Tiempo
1	1	Desnaturalización	95	2 min
2	30	Desnaturalización	95	20 s
		Hibridación	55	20 s
		Extensión	72	30 s
3	1	Extensión final	72	3 min
4	1	Refrigeración final	4	Indefinido

Para llevar a cabo el procedimiento de purificación del producto amplificado, se utilizó el sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Num Cat. A9281), el cual está diseñado para extraer y purificar fragmentos de DNA y productos de PCR a partir de un gel de agarosa y/o preparaciones directas de PCR. Este consiste de una columna que tiene una membrana, en la cual se une el DNA de interés, y a través de centrifugación se recupera el producto libre de exceso de nucleótidos, iniciadores y sales. La preparación se llevó a cabo como sigue: después de terminada y analizada una alícuota de producto de PCR a través de electroforesis en gel de agarosa para verificar la amplificación del fragmento *ANTgs*, se añadió un volumen equivalente de solución de unión a membrana a la reacción de PCR. Por otro lado, para llevar a cabo la unión del

DNA, se insertó la minicolumna con su tubo colector, y la mezcla anterior previamente realizada se transfirió a la minicolumna ensamblada. Se incubó por un min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 16000 g por 1 min, se descartó el volumen cosechado en el tubo colector, y se reinsertó nuevamente la minicolumna con su respectivo tubo colector. Luego se añadieron 700 µL de solución de lavado. Se centrifugó a 16000 g por un min, se descartó el colectado, se reinsertó la minicolumna con su respectivo tubo colector, se repitió este procedimiento con 500 µL de solución de lavado, y se centrifugó a 16000 g por 5 min. La columna de ensamblado se centrifugó por 1 min con la tapa de la microcentrífuga abierta para permitir la evaporación de cualquier residuo de etanol. Finalmente se transfirió y se ensambló la minicolumna a un tubo estéril de 1.5 mL, se añadieron 50 µL de agua libre de nucleasas a la minicolumna, y se incubó a temperatura ambiente por 1 min. Posteriormente se centrifugó a 16000 g por 1 min y el volumen colectado correspondió al producto de PCR purificado, el cual fue cuantificado mediante un nanofotómetro (Pearl IMPLÉN) para calcular posteriormente los volúmenes necesarios para llevar a cabo la adenilación y ligación en el vector de clonación pGEM-T.

#### 6.6.4. Adenilación del fragmento *ANTgs*

Para la clonación del fragmento *ANTgs* en el vector pGEM-T (Promega), el producto amplificado con *Pfu* DNA polimerasa (Agilent Cat. No BM600670.), purificado y concentrado se sometió a una reacción de adenilación con *GoTaq* DNA polimerasa (Promega Corporation). En la Tabla IX se indican las concentraciones y volúmenes de los reactivos empleados en la reacción de adenilación, esta mezcla se incubó a 72°C por 1 h.

**Tabla VIII.** Mezcla de reacción de adenilación del producto amplificado.

Reactivo	Volumen(µL)
Buffer Colorless (5X)	2.0
dATP (10 mM)	0.2
<i>GoTaq</i> DNA polimerasa (5 U/µL)	1.0
Agua libre de nucleasas	3.3
Fragmento <i>ANTgs</i> amplificado(130.0 ng/µL)	3.5
Volumen final	10.0

### 6.6.5. Clonación del fragmento *ANTgs* en el vector pGEM

Para llevar a cabo la clonación del fragmento *ANTgs* en el vector de clonación pGEM, se estimó la cantidad en nanogramos (ng) del fragmento de 1961 pb (inserto) requeridos para tener una relación vector-inserto de 1:3, considerando 3000 pb para el tamaño del vector pGEM. Para realizar dicho cálculo, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{cantidad de inserto (ng)} = \frac{\text{cantidad vector (ng)} \times \text{tamaño inserto (kb)}}{\text{tamaño vector (kb)}} \times \text{relación molar (inserto/v ector)}$$

**Ecuación 1.** Cálculo de la cantidad de inserto (ng) necesarios para la ligación en el vector pGEM.

Aplicando la ecuación anterior, se obtuvo que para obtener una relación inserto-vector de 3:1, se requieren 98 ng del fragmento *ANTgs* adenilado y 50 ng del vector pGEM. La reacción de ligación se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones del fabricante y los reactivos proporcionados por el sistema pGEM. En la Tabla IX se presenta la mezcla de reacción que se empleó para la ligación en el vector pGEM-T. La mezcla se incubó toda la noche a 4°C. Con el producto de la reacción de ligación se llevó a cabo la transformación de células *E. coli* JM109 químicamente competentes mediante el mismo procedimiento de transformación y selección de cepas descrito en la sección 6.4.3.

**Tabla IX.** Mezcla de reacción para la ligación del fragmento *ANTgs* en el vector pGEM-T vector.

Reactivo	Volumen (μL)
Buffer de ligación rápida (2X)	5.0
pGEM-T Vector (50 ng/μL)	1.0
Mezcla de reacción de adenilación (41.2 ng/μL)	2.4
DNA T4 Ligasa (3 U/μL)*	1.0
Agua ultrapura	0.6
Volumen total	10.0

\*Unidades Weiss

### **6.6.6. Caracterización del plásmido pGEMANTgs construido**

#### **6.6.6.1. Preparación del plásmido pGEMANTgs**

Al final de la incubación y aparición de colonias de *E. coli* transformadas (blancas), se aislaron las cepas transformadas, se inocularon en caldo LB suplementado con ampicilina (bactotripton 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, ampicilina 100 µg/mL), y se incubaron a 37°C con una agitación de 250 rpm durante 14-18 h para su propagación y posteriormente obtener el DNA plasmídico (DNAp) necesario para su caracterización mediante el mismo procedimiento descrito en la sección 6.4.4.2. De la preparación recuperada, se analizaron 5 µL en un gel de agarosa al 0.8% y tinción con GelRed Nucleic Acid Stain (concentración final 100X diluido en cloruro de sodio 100 mM). El resto de la preparación obtenida se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

#### **6.6.6.2. Caracterización del plásmido pGEMANTgs por PCR**

La caracterización del plásmido pGEMANTgs se llevó a cabo por PCR utilizando los iniciadores específicos para la región que codifica para la tanasa (sección 6.6.2.) (5'ALFAGSB y 3'TANGSA) y el protocolo estandarizado con la enzima *GoTaq* polimerasa (Tabla X), en donde se esperaba la amplificación de una banda de 1961 pb, correspondiente a la secuencia codificante del gen artificial de la tanasa y del péptido prepro del factor alfa de *S. cerevisiae*. Las cepas de *E. coli* conteniendo el plásmido que dieron positiva la PCR se conservaron en LB suplementado con glicerol 50% y se almacenaron a -20°C hasta su uso. El programa que se empleó para la PCR para la confirmación de la inserción del fragmento ANTgs en pGEM se describe en la Tabla XII. Una alícuota de 5 µL de cada reacción de PCR fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer de Tris-boratos-EDTA (TBE 1X; Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM), teñido posteriormente con GelRed Nucleic Acid Stain (concentración final 100X diluido en cloruro de sodio 100 mM) y analizado a través del sistema de toma de imagen Kodak EDAS-290.

**Tabla X.** Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR estandarizada con *GoTaq* DNA polimerasa para la caracterización de pGEMANTgs.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración Final
Green Buffer (5X)	5.0	1X
dNTP's (10 mM)	0.5	0.2 mM
Iniciador 5'ALFAGSB (5 μM)	2.5	0.5 μM
Iniciador 3'TANGSA (5 μM)	2.5	0.5 μM
<i>GoTaq</i> DNA Polimerasa (5 U/μL)	0.2	0.04 U/μL
DNA molde (1.43 ng/μL)	1.0	0.05 ng/μL
Agua ultrapura	13.3	-----
Volumen final	25.0	-----

\* La muestra proviene de un stock que tiene 143 ng/μL diluída 1:100 resultando una concentración de 1.43 ng/μL.

**Tabla XI.** Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para verificar la amplificación del fragmento *ANTgs* con *GoTaq* DNA polimerasa.

Etapas	Ciclos	Temperatura	°C	Tiempo
1	1	Desnaturalización	94	2 min
2	30	Desnaturalización Hibridación Extensión	94 50 72	1 min 1 min 4 min
3	1	Extensión final	72	10 min
4	1	Refrigeración final	4	Indefinido

#### 6.6.6.3. Caracterización del plásmido pGEMANTgs mediante digestión con las enzimas *Bam*HI y *Avr*II

Una vez caracterizado el plásmido pGEMANTgs por PCR, la secuencia del plásmido construido se sometió a un análisis *in silico* con el programa computacional NEBcutter (New England Biolabs, Vincze *et al.*, 2003) para determinar los tamaños teóricos de los fragmentos que se obtendrían al cortar dicho plásmido con las enzimas *Bam*HI y *Avr*II. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción con estas enzimas de acuerdo a las especificaciones del fabricante. En las tablas XIII y XIV se muestran los tamaños teóricos esperados para la caracterización de pGEMANTgs con *Bam*HI y *Avr*II, y los

volúmenes de la mezcla de reacción utilizada para la digestión del DNA plasmídico, respectivamente.

**Tabla XIII.** Tamaños teóricos esperados para la caracterización de pGEMANTgs con *Bam*HI y *Avr*II.

	<i>Bam</i> HI(pb)	<i>Avr</i> II(pb)	<i>Bam</i> HI y <i>Avr</i> II(pb)
pGEMANTgs	4969	4969	3014 1955

**Tabla XII.** Mezcla de reacción de la digestión analítica del plásmido pGEMANTgs con *Bam*HI y *Avr*II.

Reactivo	Negativo <i>Bam</i> HI o <i>Avr</i> II (μL)	Positivo <i>Bam</i> HI (μL)	Positivo <i>Avr</i> II (μL)	Positivo <i>Bam</i> HI y <i>Avr</i> II (μL)
Agua ultrapura	15.0	13.0	14.0	13.0
Buffer 4 (10X)	2.0	2.0	2.0	2.0
BSA acetilada (100X)	0.5	0.5	0.5	0.5
DNA (263 ng/μL)	2.5	2.5	2.5	2.5
<i>Bam</i> HI (10 U/μL)	0.0	1.0	0.0	1.0
<i>Avr</i> II (4 U/μL)	0.0	0.0	1.0	1.0
Volumen total (μL)	20.0	20.0	20.0	20.0

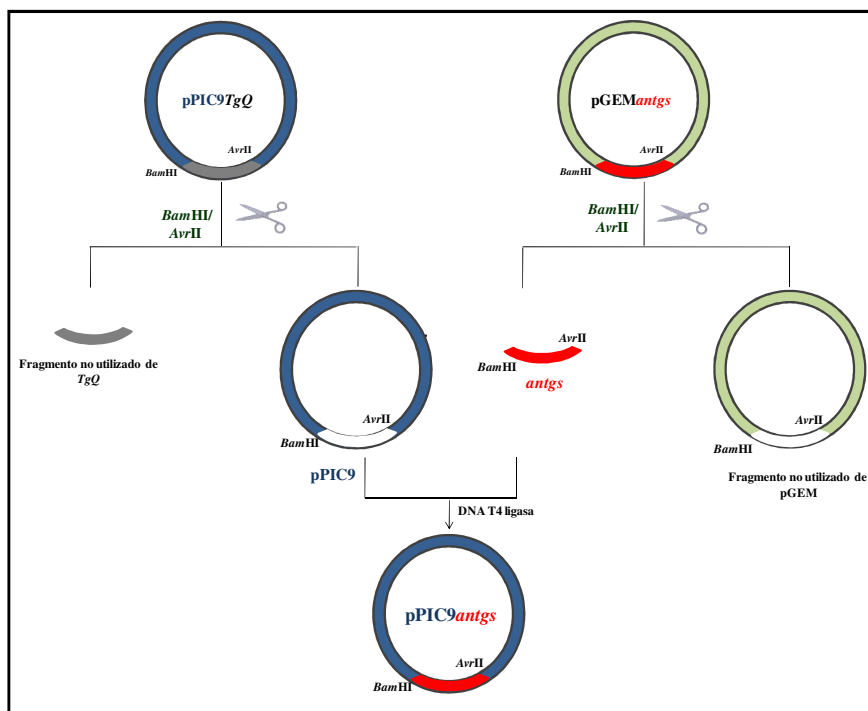
La mezcla de reacción de digestión se incubó a 37°C por 16 h. Para corroborar la presencia de los fragmentos esperados en la digestión de pGEMANTgs, una alícuota de 5 μL de la reacción enzimática fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM), teñido con GelRed Nucleic Acid Stain (concentración final 100X diluido en cloruro de sodio 100 mM) y analizado a través del sistema de imagen Kodak EDAS-290. Después de corroborada la caracterización del plásmido pGEMANTgs por digestión (Tabla XIII), dicho plásmido se sometió a una digestión preparativa (sección 6.6.7.3.).

### 6.6.7. Subclonación del fragmento ANTgs en el vector pPIC9

#### 6.6.7.1. Estrategia de clonación

Para la subclonación del fragmento ANTgs en pPIC9, se empleó el plásmido precursor pPIC9TgQ previamente construido en nuestro laboratorio (Fuentes-Garibay, 2011). Este plásmido fue digerido con las enzimas *Bam*HI y *Avr*II reemplazando el fragmento liberado (TgQ) con el fragmento ANTgs obtenido del plásmido

pGEMANTgs previamente digerido con las mismas enzimas *Bam*HI y *Avr*II, dando lugar al nuevo plásmido pPIC9ANTgs de 9688 pb (Figura 7).



**Figura 7. Estrategia utilizada para la construcción del plásmido pPIC9ANTgs.** El plásmido precursor pPIC9TgQ fue digerido con *Bam*HI y *Avr*II. El fragmento ANTgs (rojo) fue liberado del plásmido pGEMANTgs mediante la digestión con las mismas enzimas y posteriormente subclonado en el vector pPIC9 (gris), obteniéndose el vector pPIC9ANTgs.

#### 6.6.7.2. Preparación de los plásmidos de pGEMANTgs y pPIC9TgQ

Para la preparación de pGEMANTgs a mediana escala se utilizaron unidades de filtración y purificación de DNA a mediana escala (Pure Yield™ Midiprep System, Promega Num. Cat. A2492). Estas columnas consisten en una columna de limpieza y una columna de unión a membrana, montadas una sobre otra (unión a membrana parte inferior, limpieza parte superior) y conectadas a través de un colector múltiple de vacío (Promega Num cat A7231). Para la preparación de ambos plásmidos, se propagaron las cepas *E. coli* JM109 portadora de pPIC9TgQ (Fuentes-Garibay, 2011), y *E. coli* JM109 portadora de pGEMANTgs en 50 mL de LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37°C y 250 rpm durante 18 h. El paquete celular se obtuvo por centrifugación a 4000 rpm por 10 min a 4°C. Mediante el sistema previamente descrito, se obtuvo la purificación del DNA por vacío como sigue: una vez obtenido el paquete celular y

removido el exceso de medio de cultivo, se resuspendió en 3 mL de solución de resuspensión celular. Luego se añadieron 3 mL de solución de lisis celular y se mezcló cuidadosamente por inversión de 3 a 5 veces. Posteriormente, la mezcla se incubó a temperatura ambiente por un tiempo de 3 a 5 min, se añadió solución neutralizante y se mezcló cuidadosamente de 3-5 veces. La mezcla se centrifugó en un rotor de ángulo fijo (Beckman, F0850) a 8000 rpm por 30 min. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante se vertió sobre la columna ensamblada de limpieza (parte superior) que estaba a su vez sobre el colector de vacío, y se incubó el lisado de 2 a 3 min para permitir que los restos celulares permanecieran en la parte superior de la columna. Posteriormente se aplicó vacío para filtrar a través de la membrana de limpieza (columna superior) y la columna de unión (columna inferior) donde el DNA se quedó unido. El vacío se continuó por 5 min hasta que el líquido hubo pasado por ambas columnas. Al término de la elución, la columna de limpieza (superior) se desensambló, dejando ensamblada la columna de unión (inferior) en el colector múltiple de vacío, se añadieron 20 mL de solución de lavado de columna y se aplicó vacío hasta sequedad. Posteriormente se aplicó vacío por 30 s para evaporar el etanol residual. La columna de unión se desensambló del colector de vacío y se colocó en un tubo de centrifuga de 50 mL (Corning Cat. No. 430829), y se añadieron 600 µL de agua libre de nucleasas para eluir el DNA. El tubo se centrifugó en un rotor de columpio (Beckman, Rotor S4180C) a 3000 g por 5 min, se colectó el filtrado, se transfirió a un tubo de 0.65 mL (de cada preparación respectiva), y se cuantificó mediante el nanofotómetro Pearl. Para eliminar las posibles nucleasas, las muestras se calentaron a 65°C por 20 min y se guardaron a 4°C hasta su uso.

#### **6.6.7.3. Digestión preparativa de los plásmidos pGEMANTgs y pPIC9TgQ con las enzimas *Bam*HI y *Avr*II**

El plásmido pGEMANTgs se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Avr*II de NEB en un volumen de reacción de 40µL y la mezcla de reacción que se muestra en la Tabla XV. El plásmido precursor pPIC9TgQ se sometió también a la digestión con las mismas enzimas de restricción. Ambas reacciones se incubaron a 37°C por 16 h y se sometieron a una electroforesis preparativa en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X (Tris-



HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM), para poder obtener el fragmento de pPIC9 y el fragmento *ANTgs*.

**Tabla XIII.** Mezcla de reacción de la digestión preparativa de pPIC9TgQ y pGEMANTgs con *Bam*HI y *Avr*II.

Reactivo	pGEMANTgs (μL)	pPIC9TgQ (μL)
Agua ultrapura	18.3	17.0
Buffer 4 NEB	4.0	4.0
BSA acetilada 100X	1.0	1.0
pGEMANTgs (476 ng/μL)	12.7	-----
pPIC9TgQ (428 ng/μL)	-----	14.0
<i>Bam</i> HI (100 U/μL)	2.0	2.0
<i>Avr</i> II (4 U/μL)	2.0	2.0
Volumen total	40.0	40.0

La purificación preparativa de los fragmentos a clonar se realizó como sigue: al depósito de la cámara de electroforesis se transfirió SDS 0.1% y se dejó reposar durante 1 h. Cuidadosamente éste fue retirado de la cámara, y la cámara se enjuagó tres a cinco veces con agua estéril, se decantó el agua y se vertió TBE 1X libre de nucleasas (estéril). Posteriormente se realizó una electroforesis en agarosa 0.8% en TBE 1X libre de nucleasas (estéril). Una vez finalizada la electroforesis, el gel se colocó sobre una película de parafilm fino y éste a su vez sobre el transiluminador, con la intensidad de luz UV con menor daño al DNA (365 nm). Con la ayuda de una navaja estéril se cortaron los fragmentos de interés (el correspondiente a pPIC9 y el fragmento *ANTgs*). Cada uno de los fragmentos obtenidos se colocó en un tubo de microcentrífuga de 2 mL nuevo estéril pre-pesado, y por diferencia de pesos se obtuvo el peso total de la agarosa contenida en el tubo. Los fragmentos del gel de agarosa recuperados fueron purificados con el Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Num. Cat. A9281) (sección 6.6.3.).

La concentración de DNA de los fragmentos purificados se determinó mediante un nanofotómetro Pearl (Implen GmbH, München, Alemania). El DNA purificado del vector (pPIC9) y del inserto (*ANTgs*) fueron guardados a 4°C hasta su ligación.

**Tabla XIV.** Fragmentos teóricos esperados en la digestión preparativa de pPIC9TgQ y pGEMANTgs con *Bam*HI y *Avr*II

pGEMANTgs(pb)	pPIC9TgQ(pb)
3014	7733
1955	1004

#### 6.6.7.4. Ligación del fragmento *ANTgs* con el vector pPIC9 y transformación en *E. coli*

Para llevar a cabo la ligación del fragmento *ANTgs* en el vector de expresión pPIC9, se estimó la cantidad en nanogramos (ng) del fragmento de 1961 pb (inserto) requeridos para tener una relación molar vector-inserto de 1:5, considerando 8000 pb para el tamaño del vector pPIC9. Aplicando la ecuación 1 de la sección 6.6.5, se obtuvo que para obtener una relación vector-inserto de 1:5 se requirirían 123.5 ng del fragmento *ANTgs* y 103.3 ng del vector pPIC9. La reacción de ligación se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones del fabricante y los reactivos proporcionados por el sistema de la ligasa T4 (Promega Cat. No. M1801). La mezcla de reacción (Tabla VII) se realizó en tubos de 0.2 mL, conteniendo la cantidad de vector-inserto (pPIC9*ANTgs*) calculada, así como los componentes necesarios para su ligación (agua libre de nucleasas y buffer) con la enzima T4 DNA ligasa. Se prepararon 2 mezclas, la correspondiente a la muestra de reacción de 10 µL (con ligasa, Tabla XVII), y el control negativo (mezcla de la Tabla XVII, excepto ligasa). Ambas mezclas se incubaron a 4°C por 96 h. Para el análisis por electroforesis de la ligación, se tomaron 5 µL de cada una de las mezclas de reacción (con y sin ligasa). Del resto de la mezcla con ligasa se emplearon 2 µL para la transformación de *E. coli* JM109 (Promega Num. Cat. L1001) calciocompetentes. En la tabla XVII se muestran los componentes de la reacción de ligación del fragmento *ANTgs* con el vector pPIC9. La transformación de células de *E. coli* JM109 con el vector pPIC9*ANTgs* contruido se realizó con una mezcla de 50 µL de células calciocompetentes y 2 µL de la mezcla de reacción de ligación con el vector pPIC9*ANTgs* siguiendo el protocolo de transformación que se describe en el apartado 5.4.3.

**Tabla XV.**Componentes de la reacción de ligación del fragmento *ANTgs* con el vector pPIC9.

Reactivo	Volumen (μL)
Agua ultrapura	3.6
Buffer de ligación 10X	1.0
Vector pPIC9 (54.4 ng/μL)	1.9
Fragmento <i>ANTgs</i> (49.4 ng/μL)	2.5
Ligasa (3 U/μL)*	1.0
Volumen final de ligación	10.0
*Unidades Weiss	

#### 6.6.7.5. Caracterización del plásmido pPIC9*ANTgs* construido

Las cepas transformadas que crecieron en placas de LB con ampicilina, se inocularon en medio LB líquido con ampicilina (Tryptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, ampicilina 100 μg/mL), y se incubaron a 37°C y 250 rpm durante 14-18 h para obtener el DNA plasmídico mediante la metodología descrita en la sección 6.4.4.1. La preparación obtenida se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con GelRed Nucleic Acid Stain (concentración final 100X diluido en cloruro de sodio 100 mM). El resto de la preparación se almacenó a 4°C hasta su posterior uso. La caracterización del plásmido pPIC9*ANTgs* se llevó a cabo por PCR utilizando los iniciadores específicos del gen artificial de tanasa (5'ALFAGSB y 3'TANGSA) para obtener una banda de 1961 pb correspondiente a la secuencia *ANTgs* clonada. Las cepas conteniendo el plásmido caracterizado por PCR, se conservaron en LB suplementado con glicerol a una concentración final del 50% y se almacenaron a -20°C hasta su uso. La mezcla de reacción para la caracterización del plásmido pPIC9*ANTgs* se resume en la tabla XVIII. El programa que se empleó para la caracterización por PCR con GoTaq DNA polimerasa fue el mismo que el descrito en la Tabla XII. Una alícuota de 5 μL de cada reacción de PCR fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer de Tris-boratos-EDTA (TBE 1X, Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM), teñido posteriormente con GelRed Nucleic Acid Stain (concentración final 100X diluido en cloruro de sodio 100 mM) y analizado a través del sistema de toma de imagen Kodak EDAS-290.

**Tabla XVI.** Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR para la caracterización del plásmido pPIC9ANTgs.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final
Green Buffer (5X)	5.0	1X
dNTP's (10 mM)	0.5	0.2 mM
Iniciador 5'ALFAGSB (5 μM)	2.5	0.5 μM
Iniciador 3'TANGSA (5 μM)	2.5	0.5 μM
GoTaq DNA polimerasa (5 U/μL)	0.2	0.03 U/μL
DNA pPIC9ANTgs(0.997-1.5 ng/μL)*	1.0	0.03-0.06 ng/μL**
Agua ultrapura	13.3	-----
Volumen final	25.0	-----

\* La muestras provienen de stock que tienen concentraciones de 99.7- 151.6 ng/μL que diluidas 1:100 resultan en una concentración de 0.997- 1.5 ng/μL.

### 6.7. Construcción de cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras del gen sintético ANTgs capaces de producir y secretar la tanasa de *A. niger* GH1

Los vectores de integración del sistema de *P. pastoris* como el pPIC9, presentan dos regiones susceptibles para la recombinación con el genoma de la levadura: la región *HIS4* y el extremo 5' *AOX1* en donde se pueden llevar a cabo eventos de integración sitio dirigida por recombinación homóloga, generándose cepas genéticamente estables. Por lo que dependiendo de la estrategia experimental diseñada, se selecciona la región de integración y por consiguiente la enzima requerida para la preparación del plásmido. En cepas de *P. pastoris his4* como las cepas KM71, los eventos de inserción génica en el locus *his4* dan lugar a un evento de entrecruzamiento simple entre el locus *his4* del cromosoma y la región *his4* del vector. Debido a que el locus *AOX1* no está involucrado en este evento de recombinación, el fenotipo de las transformantes es His<sup>+</sup> y continúa siendo Mut<sup>s</sup> tal como lo es la cepa hospedera KM71. Para llevar a cabo la transformación de células de *P. pastoris* se recomienda usar vectores linearizados que expongan las regiones susceptibles a la recombinación seleccionada. La digestión con *SalI* del plásmido a integrar favorece que se lleve a cabo un evento de entrecruzamiento simple en el locus *his4* del genoma de *P. pastoris*, para generar cepas His<sup>+</sup>Mut<sup>s</sup> si las células hospederas son del tipo KM71. Por consiguiente, el vector pPIC9ANTgs fue digerido con *SalI*, y confirmada su linearización fue utilizado para transformar la cepa

KM71 de *P. pastoris* por medio de electroporación. La cepa de *P. pastoris* KM71 utilizada, posee un defecto en el gen que codifica para la enzima histidinol deshidrogenasa, el cual se reconstituyó al combinarse el genoma de *P. pastoris* con el vector, lo cual permite seleccionar las células de levadura transformadas en un medio selectivo carente de histidina. Las colonias transformadas se aislaron y propagaron en un medio complejo para levaduras, para llevar a cabo la extracción del DNA genómico y poder realizar la caracterización genotípica y fenotípica.

#### **6.7.1. Preparación a mediana escala del plásmido pPIC9ANTgs**

De una preparación de DNA plasmídico obtenida a mediana escala mediante el sistema Pure Yield™ Plasmid Midiprep System (Promega Num. Cat. A2492) (sección 6.6.7.2) se obtuvieron 266.8µg totales del plásmido pPIC9ANTgs a una concentración de 667ng/µL (volumen obtenido total de 400 µL). Todo el volumen de la preparación se colocó en unidades de filtración-concentración Microcon YM-3 (Millipore Cat. No. 42404), el volumen se vertió sobre el filtro y éste a su vez sobre el colector de desechos. Se centrifugó a 14000 rpm a temperatura ambiente por 30 min, y el filtrado fue desechado a través del tubo colector. Transcurrido este tiempo, se invirtió el filtro y se colocó en un nuevo tubo colector, el cual fue centrifugado a 3000 g por 10 min a 4°C. Se recuperó un volumen de 50 µL y se cuantificó la concentración de DNA con el nanofotómetro Pearl. Con 13.4 µL del concentrado obtenido, se realizó la reacción de digestión preparativa con la enzima *SalI* (Promega Num. Cat. R4054), de acuerdo a los reactivos y volúmenes que se presentan en la tabla XIX. La reacción se incubó a 37°C por 16 h, y posteriormente a 60°C por 20 min. Terminada la incubación, se tomaron 0.5 µL para su análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X teñido con GelRed Nucleic Acid Stain (Bioline Cat. No 41003.). Confirmada la linearización del plásmido pPIC9ANTgs, el volumen de digestión restante se colocó en unidades YM3 y se agregaron 100 µL de agua libre de nucleasas, se centrifugó a temperatura ambiente a 14000 rpm, y se repitió 3 veces este procedimiento de lavado con 100 µL de agua libre de nucleasas cada uno. El último lavado se llevó a cabo hasta obtener un volumen final de 5 µL, volumen adecuado para la transformación de cepas KM71 de *P. pastoris*.

**Tabla XVII.** Mezcla de reacción en la digestión preparativa de pPIC9ANTgs con *SalI*

Reactivo	Volumen (μL)
Agua ultrapura	3.1
Buffer D	2.0
BSA 100X (10 mg/mL)	0.5
DNA(2.98μg/μL)	13.4
<i>SalI</i> (80 U/μL)	1.0
Volumen Total	20.0

Para la preparación de células de *P. pastoris* KM71 electrocompetentes, se llevó a cabo el siguiente procedimiento. A partir del vial de células KM71 (Invitrogen Num. Cat. K1730-01), se tomó una alícuota con una micropuntilla amarilla estéril, se inoculó un tubo cónico de 50 mL (Corning Num. Cat.430829) conteniendo 10 mL de caldo YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%), y se creció toda la noche a 30°C con agitación constante de 250 rpm. A partir de las células reactivadas, se inocularon 500 mL de caldo YPD fresco contenidos en un matraz de 2 L (Pyrex No. 4980 Stopper No. 10) de tal manera que su DO<sub>600</sub> inicial fue de 0.1 y se cultivaron a 30°C y 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.6-1.0 (tiempo aproximado de 4-6 h). El cultivo se centrifugó a 4000 rpm y 4°C por un tiempo de 5 min. Se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 100 mL de YPD suplementado con buffer HEPES (Research Organics Num. Cat. 9592H-100GR) (extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%, Hepes 20 mM). El paquete celular resuspendido con YPD-HEPES fue vertido en un matraz de 1 L (Pyrex No. 4080 Stopper No. 9), se añadieron cuidadosamente 2.5 mL de DTT 1M (Promega Num. Cat. V3151) y se incubó a 30°C y 250 rpm por 15 min. Posteriormente, se agregaron 400 mL de agua fría estéril al matraz con la mezcla y se centrifugó el volumen total hasta obtener el paquete celular. El paquete celular se resuspendió en 250 mL de agua fría estéril y se centrifugó nuevamente hasta obtener el paquete celular. Ambos lavados con el agua estéril fueron realizados a 4°C y 250 rpm por 10 min. El paquete celular obtenido fue resuspendido en 20 mL de sorbitol 1M frío y estéril (Sigma Num. Cat. S1876), y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 1 mL de sorbitol 1M frío y estéril (en esta etapa las células están competentes y listas para su

uso). Se realizaron alícuotas de 40  $\mu\text{L}$  de células competentes y se colocaron en tubos de microcentrífuga de 2.0 mL (MBP Num. Cat. 3434) estériles (en esta etapa las células pueden ser mantenidas a 4°C y ser usadas directamente para transformación instantánea y/o ser congeladas para usos posteriores). Las alícuotas de células preparadas se envolvieron en varias capas de papel secante, posteriormente se congelaron lentamente a -70°C y se almacenaron hasta su uso.

### **6.7.2. Transformación de *P. pastoris* KM71**

Previo a la transformación de *P. pastoris*, las celdas de electroporación (BioRad Num. Cat. 1652086) fueron colocadas en hielo por 2 min. Para la transformación, se descongeló lentamente uno de los tubos congelados conteniendo las células competentes (Sección 6.7.1) y se añadieron 3.7  $\mu\text{L}$  (10.1  $\mu\text{g}$  totales) del plásmido pPIC9ANTgs previamente linearizado (Tabla XIX) La mezcla de células-DNA se colocó en las celdas bajo esterilidad y éstas a su vez se colocaron cuidadosamente en el tren de carga del electroporador (BioRad Gene Pulser II) habiendo ajustado previamente las condiciones eléctricas (Tabla XX). Una vez que se llevó a cabo la descarga eléctrica, se retiró cuidadosamente la celda, se añadió a la celda 1 mL de sorbitol 1 M frío y estéril bajo condiciones de esterilidad, y se homogenizó por inversión de 5 a 10 veces o hasta que la mezcla quedara homogénea. Posteriormente, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla y se sembraron en placas Petri conteniendo medio sólido RBD (sorbitol 1 M, dextrosa 2%, YNB 1.34%, biotina  $4 \times 10^{-5}\%$ , aminoácidos 0.005%, agar 2%). Adicionalmente, 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla se sembraron en placas Petri conteniendo medio sólido YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%, agar 2%). En ambos medios se utilizó la técnica de extensión en placa con un asa de extensión. Las placas Petri se incubaron a 30°C por 120 h hasta observar la aparición de colonias blancas y redondas. En la tabla XIX se muestran los parámetros de la electroporación empleados en la transformación de células de *P. pastoris* KM71 electrocompetentes con el plásmido linearizado pPIC9ANTgs.

**Tabla XVIII.** Parámetros de electroporación empleados en la transformación del vector linealizado con células de *P. pastoris*.

Celda (mm)	Volumen de células (μL)	Voltaje (V)	Capacitancia (μF)	Resistencia (Ω)	Campo de Fuerza (kV/cm)	Longitud de pulso (mseg)
2	40	1500	25	400	7500	5

### 6.7.3. Caracterización genotípica de las cepas recombinantes KM71ANT

La caracterización genotípica de las colonias transformadas se realizó determinando la ausencia del gen *AOX1* y la integración del gen heterólogo en el genoma de cada una de las cepas mediante PCR. Este análisis por PCR se realizó con el DNA genómico de cada una de las colonias His<sup>+</sup> obtenidas, y se emplearon el iniciador 5'AOX (5'-GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC-3'), el cual hibrida en la región 5'AOX1, y el iniciador 3'AOX (5'-GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC-3'), que hibrida en la región 3'AOX1 TT. Estas regiones se encuentran en el cassette de expresión que contiene el gen heterólogo y que está integrado en el genoma de la levadura. La PCR del DNA genómico de las cepas recombinantes daría como resultado un producto amplificado de 2158 pb, que contiene las secuencias del vector más la secuencia codificante de la tanasa recombinante (Figura 8).

Para la extracción del DNA genómico de cada una de las colonias transformadas de *P. pastoris*, se empleó una modificación a la técnica de TSNT (Viader-Salvadó *et al.*, 2006). Cada una de las colonias obtenidas se inoculó en 10 mL de YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%) e incubó a 30°C a 250 rpm durante 24-48 h, hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 6-8. El paquete celular se obtuvo de 2 mL de cultivo, mediante centrifugación a 16000 g (22R Beckman Coulter) durante 5 min a temperatura ambiente. El paquete celular se resuspendió en 200 μL de solución amortiguadora de lisis TSNT (Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0), se agitó por inversión 20 veces y en un vortex por 5 min. Posteriormente, se agregaron 500 μL de fenol saturado con Tris-HCl pH 8.0, y la mezcla se agitó por inversión 20 veces. Se agregaron 500 μL de SEVAG (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1) y se mezcló en vortex por 5 min. A la suspensión generada se le adicionaron 200 μL de TE 1X pH 8.0, se agitó por inversión cinco veces y se centrifugó a 16000 g (22R

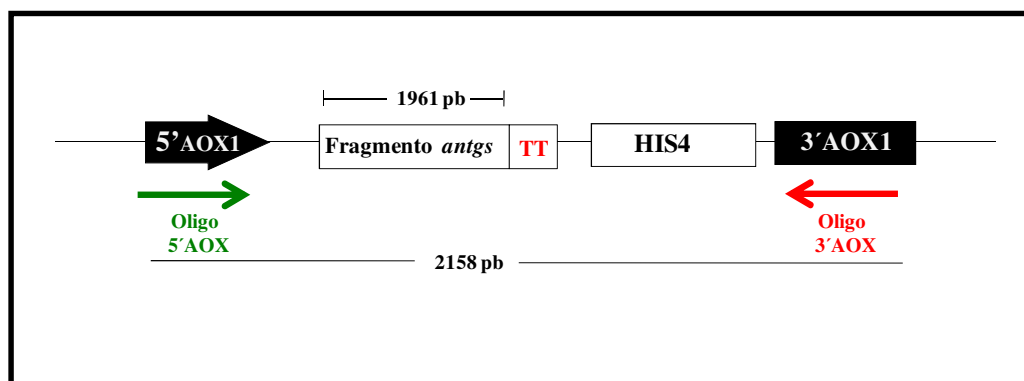


Bekcman Coulter) durante 10 min a temperatura ambiente. La fase acuosa se recuperó con una pipeta y se depositó en un tubo de microcentrífuga de 2 mL, se agregó 1 mL de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y se incubó a -20°C por 60 min para precipitar el DNA. El DNA se recuperó por centrifugación a 16000 g (22R Beckman Coulter) a 4°C, durante 30 min y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente la pastilla de DNA se lavó con 1000 µL de etanol al 70%, la mezcla se centrifugó a 16000 g (22R Beckman Coulter) a 4°C, durante 15 min, se decanto el sobrenadante y la pastilla obtenida se resuspendió en 50µL de TE 1X y se calentó a 65°C durante 20 min para eliminar DNAsas. Para corroborar la integración de cassette de expresión en el genoma de las cepas KM71 de *P. pastoris*, el DNA genómico de las cepas aisladas fue analizado por PCR empleando el par de iniciadores de AOXdescrito previamente (Tabla II C). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 25 µL, de acuerdo a los reactivos y volúmenes de la tabla XXI, utilizando la GoTaq DNA polimerasa en buffer green de Promega Corporation.

**Tabla XIX.**Volúmenes y reactivos necesarios para el análisis de integración por medio de PCR con iniciadores dirigidos a las regiones de AOX1.

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración final
Green Buffer (5X)	5.0	1X
dNTP's (10 mM)	0.5	0.2 mM
Iniciador 5'AOX (5 µM)	2.5	0.5 µM
Iniciador 3'AOX (5 µM)	2.5	0.5 µM
GoTaq DNA polimerasa (5 U/µL)	0.2	0.04 U/µL
DNA molde (110.5-298.5 ng/µL)	1.0	4.42 – 11.94 ng/µL
Agua ultrapura	13.3	-----
Volumen final	25.0	-----

El programa empleado para el análisis de integraciónpor PCR del cassette de expresión en el DNA genómico de *P. pastoris* se muestra en laTabla XX. Una alícuota de 5 µL de cada reacción de PCR fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer de Tris-boratos-EDTA (TBE 1X; Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM), teñido con GelRed Nucleic Acid Stain (concentración final 100X diluido en cloruro de sodio 100 mM) y analizado a través del sistema de toma de imagen Kodak EDAS-290. En la Tabla XX se muestrael programa del termociclador empleado.



**Figura 8. Representación gráfica del plásmido pPIC9ANTgs y los sitios de apareamiento de los iniciadores específicos 5'AOX y 3'AOX.** Se muestra el tamaño de los fragmentos amplificados mediante PCR.

**Tabla XX.** Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para verificar la integración del cassette de expresión en el genoma de *P. pastoris*.

Etapa	Ciclos	Temperatura	°C	Tiempo
1	1	Desnaturalización	94	2 min
2	30	Desnaturalización Hibridación Extensión	94 50 72	1 min 1 min 2 min
3	1	Extensión final	72	10 min
4	1	Refrigeración final	4	Indefinido

#### 6.7.4. Caracterización fenotípica (fenotipo ANT<sup>+</sup>) de las cepas recombinantes KM71ANT

La caracterización fenotípica (fenotipo ANT<sup>+</sup>) de las cepas recombinantes KM71ANT construidas se llevó a cabo evaluando la inducción del gen heterólogo (gen sintético que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1) en cultivos en condiciones de inducción de una de las cepas recombinantes y evaluando la producción extracelular de tanasa a través de la concentración de proteínas totales y la actividad volumétrica de tanasa en el medio de cultivo libre de células (Figura 9).

#### 6.7.4.1. Cultivo bajo condiciones de inducción del gen heterólogo de las cepas KM71ANT

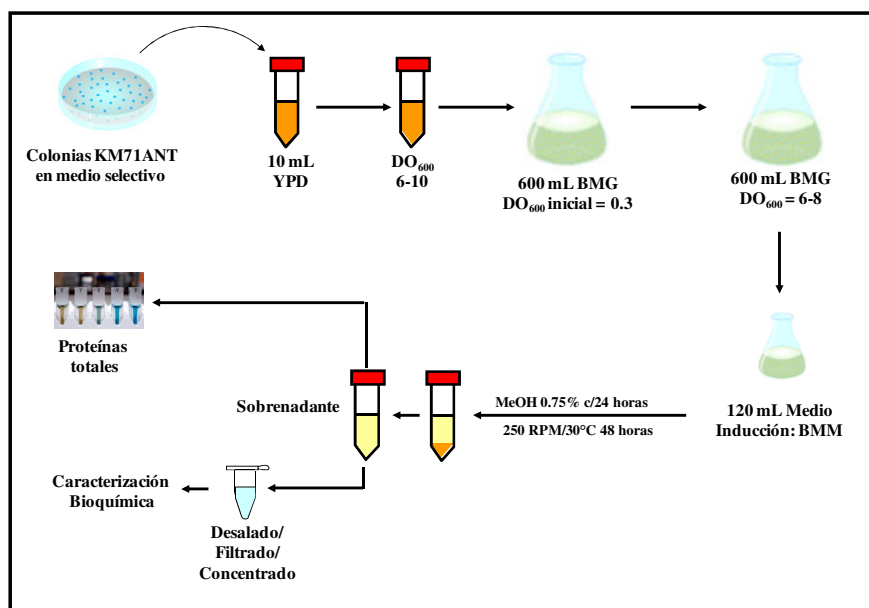
Los cultivos de las cepas KM71ANT construidas se realizaron en tres fases descritas a continuación. La composición de los medios y las condiciones de cultivo se describen en las tablas XXI y XXII. **Fase de activación:** Esta fase fue constante para todos los ensayos realizados en la cual la cepa se reactivó en un medio rico (YPD) a partir de la cepa conservada en YPD suplementado con glicerol a una concentración final de 15%. En un tubo Corning de 50 mL de capacidad (Corning Cat. No. 430829) conteniendo 10 mL de YPD, se inocularon 100  $\mu$ L del cultivo en conserva y se incubó a 30°C durante 24 h con agitación constante de 250 rpm en una incubadora de agitación Environ Shaker de *Lab-Line*. **Fase de crecimiento:** Las células una vez reactivadas en YPD se utilizaron como inóculo para realizar un cultivo en BMG (buffer de fosfatos 100 mM, YNB 1.34%, glicerol 1%, biotina  $4 \times 10^{-5}\%$ ), el cual se realizó en matraces de 6000 mL conteniendo 600 mL de BMG. El cultivo se ajustó a una DO<sub>600</sub> inicial de 0.3 y se incubó a 30°C con agitación constante de 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600</sub>final de 6-8 en un tiempo de 12 h. **Fase de inducción:** La biomasa obtenida en BMG se recuperó por centrifugación a 4000 rpm, se resuspendió en 120 mL de medio BMM (buffer de fosfatos 100 mM, YNB 1.34%, biotina  $4 \times 10^{-5}\%$ ) con metanol al 0.75% (cada 24 h), y se incubó a 30°C y 250 rpm. Las condiciones de cultivo fueron constantes y la composición del medio de inducción se describe en las tablas XXIII y XXIV. Del cultivo realizado se tomó muestra al final de la fase de inducción, se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min y al medio de cultivo libre de células se le determinó proteínas totales (sección 6.7.4.2., Tabla XXIII) y se detectó el producto recombinante por geles de SDS-poliacrilamida (ver sección 6.8.5., Tabla XXVIII). También se realizó una caracterización bioquímica de la tanasa producida en extractos semipurificados del medio de cultivo libre de células (sección 6.8.1.).

**Tabla XXI.** Composición de los medios de cultivo utilizados.

Medio de cultivo	Composición Final
BMG	Buffer de fosfatos 100 mM pH 6.0, glicerol 1%, base de nitrógeno de levadura (YNB) 0.34%, biotina $4 \times 10^{-5}$ %.
BMM	Buffer de fosfatos 100 mM pH 6.0, metanol 0.75%, base nitrogenada de levadura (YNB) 1.34%, biotina $4 \times 10^{-5}$ %.

**Tabla XXII.** Resumen de las condiciones experimentales de los cultivos en matraz de KM71ANT.

Ensayo	Fase de Crecimiento	Fase de Inducción
Determinación de Fenotipo ANT <sup>+</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- BMG 600 mL</li> <li>- DO<sub>600</sub> inicial: 0.3</li> <li>- DO<sub>600</sub> final: 6-8</li> </ul>	BMM: 120 mL DO <sub>600</sub> inicial: 25-30 Tiempo de inducción: 48 h Metanol: 0.75% cada 24 h Temperatura de inducción: 30°C

**Figura 9.** Representación esquemática del protocolo experimental para los cultivos de la determinación del fenotipo ANT<sup>+</sup> y la posterior caracterización bioquímica de la enzima producida

#### 6.7.4.2. Concentración de proteínas totales en el medio de cultivo libre de células

En la determinación de las proteínas totales extracelulares, se utilizaron las muestras del cultivo inducido (sección 6.7.4.1.) de una de las cepas obtenidas crecida en BMM bajo

las condiciones de cultivo realizadas de acuerdo al procedimiento descrito (Tablas XXI y XXII).

La concentración de proteínas extracelulares totales se determinó midiendo en un espectrofotómetro (Beckman Coulter) la absorbancia a 595 nm que se presenta por la formación de un complejo azul entre proteínas y el azul brillante de Coomassie G-250. Se empleó ASB (albúmina sérica bovina) como estándar de concentración en un intervalo de 0-45  $\mu\text{g/mL}$  (Bradford, 1976). A continuación se describe el método empleado: se pesaron 5 mg de ASB en un matraz de aforación de 5 mL y se aforó con agua destilada (ASB 1 mg/mL); se colocaron 250  $\mu\text{L}$  de esta solución en un matraz de aforación de 5 mL y se aforó a 5 mL con agua destilada (50  $\mu\text{g/mL}$ ). Para el caso del reactivo de Coomassie se disolvieron 10 mg del colorante azul brillante de Coomassie G-250 en 5 mL de etanol al 95%. Se agitó vigorosamente y se agregaron 10 mL de ácido fosfórico al 85%. Se mezcló vigorosamente por 20-30 min, se llevó a 100 mL con agua destilada, se agitó por 20-30 min y se filtró con papel Whatman No. 1 para eliminar el colorante no disuelto. Se realizó la curva de calibración por triplicado mezclando un volumen determinado de la solución de ASB 50  $\mu\text{g/mL}$ , otro volumen determinado de agua destilada y 800  $\mu\text{L}$  de solución de reactivo de Coomassie, tal como se describe en la tabla XXV y determinando la absorbancia de la mezcla a una longitud de onda de 595 nm. Se mezclaron 200  $\mu\text{L}$  de muestra y 800  $\mu\text{L}$  de solución de reactivo de Coomassie y se determinó la absorbancia a 595 nm de la mezcla. El cálculo de la concentración de proteínas en el medio de cultivo se realizó por interpolación matemática del valor de absorbancia de la muestra en la recta de calibración y teniendo en cuenta el factor de dilución de la muestra.

**Tabla XXIII.** Mezcla de reacción para la determinación de la curva de calibración del método de Bradford.

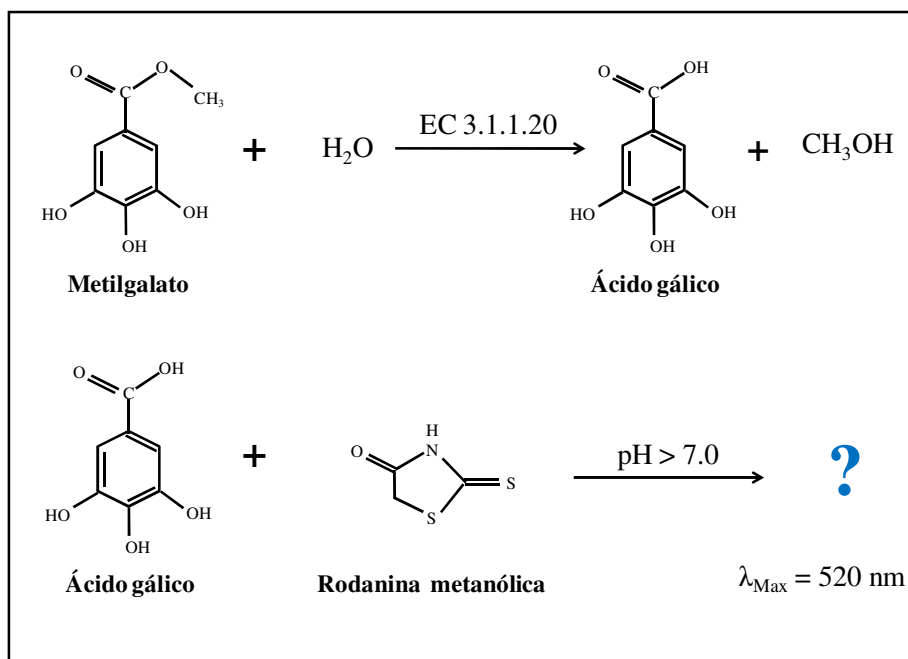
Estándar ( $\mu\text{g/mL}$ )	ASB 50 $\mu\text{g/mL}$ ( $\mu\text{L}$ )	Agua destilada ( $\mu\text{L}$ )
Blanco	0	200
5.0	20	180
7.5	30	170
15.0	60	140
22.5	90	110
30.0	120	80
45.0	180	20

#### **6.7.4.3. Determinación de la actividad enzimática de tanasa**

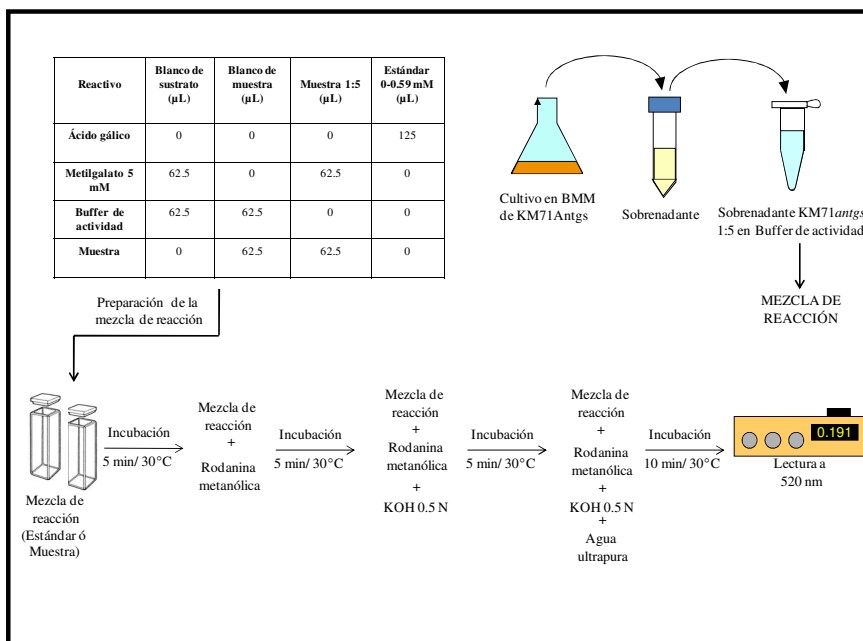
La determinación de la actividad enzimática de tanasa se llevó a cabo mediante una modificación del método descrito por Sharma (Sharma *et al.*, 2000). Esta determinación enzimática consiste en la medición del ácido gálico liberado durante la reacción enzimática utilizando como sustrato un éster del ácido gálico como el metilgalato. La medición del ácido gálico liberado se basa en la formación de un cromóforo entre dicho ácido y la 2-tio-4-cetotiazolidina, también conocida como rodanina (Figura 10). El sustrato utilizado para la reacción enzimática fue el 3,4,5-trihidroxibenzoato de metilo (metilgalato, Sigma Aldrich Corporation, Cat. No. 274194-5G, P.M. 184.15 g/mol). La reacción enzimática se realizó incubando 5 min a 30°C empleando distintas diluciones de la enzima (muestra) para determinar a qué concentración de enzima la generación de producto es directamente proporcional a la concentración de enzima. Para cada uno de los ensayos se consideraron dos blancos como se muestra en la Tabla XXVI. El blanco de sustrato se incluye para asegurarse que el sustrato (metilgalato) no libera ácido gálico espontáneamente durante la reacción o si lo hace sea en baja proporción. El blanco de muestra se incluye para considerar la posible concentración del ácido gálico presente en la muestra o liberado espontáneamente durante la reacción en ausencia de la enzima. La absorbancia de ambos blancos hay que tomarlas en consideración al momento de realizar los cálculos de la actividad enzimática de tanasa (Figura 10).

En la Tabla XXVI se muestra los volúmenes empleados para la mezcla de reacción así como los tiempos de incubación necesarios para la determinación actividad enzimática de tanasa.

Para cada ensayo de actividad enzimática se realizó una curva de calibración con triplicados de 6 estándares de ácido gálico (P.M. 170.12 g/mol, Sigma Aldrich Corporation Cat. No. G7384-100G) de diferentes concentraciones. La mezcla de reacción de los estándares para la curva de calibración se realizó como se muestra en la Tabla XXVII.



**Figura 10. Representación general de las reaccion para la determinación de actividad enzimática de tanasa.**



**Figura 11. Representación general de la determinación de actividad enzimática de tanasa.** Se describe el procedimiento para la determinación de la actividad enzimática de la tanasa, donde se utilizó como sustrato metilgalato 5 mM.

**Tabla XXIV.** Mezcla de reacción e incubación para la determinación actividad enzimática de tanasa.

Reactivo/ Mezcla de Reacción	Blanco de Sustrato ( $\mu\text{L}$ )	Blanco de Muestra ( $\mu\text{L}$ )	Muestra 1:5 ( $\mu\text{L}$ )	Curva Patrón: 125 $\mu\text{L}$ de Ácido gálico
Metilgalato*(10 mM)	62.5	0	62.5	0.0-0.59mM
Buffer de reacción**	62.5	62.5	0	0
Enzima-Muestra	0	62.5	62.5	0
Incubación	30°C, 5 min			30°C, 5 min
Rodanina metanólica*** ( $\mu\text{L}$ )	75			75
Incubación	30°C, 5 min			30°C, 5 min
KOH 0.5 N ( $\mu\text{L}$ )	50			50
Incubación	30°C, 5 min			30°C, 5 min
Agua bidestilada ( $\mu\text{L}$ )	1000			1000
Incubación	30°C, 10 min			30°C, 10 min
Lectura	520 nm			520 nm

\*Sustrato: Metilgalato 10mM en buffer de citratos 50 mM, pH 5.0\*\* Buffer de reacción: Buffer de citratos 50 mM, pH 5.0

\*\*\* Rodanina metanólica: 0.667% (p/v) en metanol\*\*\*\* Ácido gálico 543.4  $\mu\text{M}$  en buffer de citratos (50 mM, pH 5.0)

**Tabla XXV.**Curva de calibración para la determinación de ácido gálico liberado en los ensayos de actividad enzimática de tanasa.

Estándar de ácido gálico (mM)	Ácido gálico en buffer de citratos ( $\mu\text{L}$ )	Buffer de citratos ( $\mu\text{L}$ )	Total ( $\mu\text{L}$ )
0.0	0	125	125
0.12	25	100	125
0.24	50	75	125
0.35	75	50	125
0.47	100	25	125
0.59	125	0	125

Para cuantificar el ácido gálico liberado se restaron las absorbancias del blanco de muestra ( $Abs_{520\text{blanco muestra}}$ ) y blanco de sustrato ( $Abs_{520\text{blanco sustrato}}$ ) a la absorbancia de la muestra ( $Abs_{520\text{muestra}}$ ), y así calcular la absorbancia que genera el ácido gálico liberado en la reacción enzimática ( $Abs_{AGL}$ ). Con este valor de incremento de absorbancia se calculó la concentración del ácido gálico liberado ( $C_{AGL}$ ) mediante una interpolación matemática en una curva estándar de 0.0 a 0.59  $\mu\text{M}$  de ácido gálico en buffer de citratos. En las ecuaciones 2 y 3 se muestran el cálculo de la absorbancia y concentración del ácido galico liberado, respectivamente.



$$Abs_{AGL} = Abs_{520muestra} - Abs_{520\text{ blanco muestra}} - Abs_{520\text{ blanco sustrato}}$$

**Ecuación 2. Cálculo de la absorbancia del ácido gálico liberado.**

$$C_{AGL} \text{ (mM)} = \frac{(Abs_{AGL} - b)}{m}$$

**Ecuación 3. Cálculo de la concentración de ácido gálico liberado.**

Donde m y b son la pendiente y la coordenada en el origen de ordenadas de la recta de calibración, respectivamente.

Una unidad de tanasa (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de ácido gálico por min bajo las condiciones del ensayo (pH 5, 30°C). Por lo tanto, la actividad volumétrica de tanasa (AVT) expresada en U/mL se calculó con la siguiente ecuación:

$$AVT(U/mL) = 0.4 \cdot C_{AGL} \text{ (mM)} \cdot FD$$

**Ecuación 4. Cálculo de la actividad volúmetrica de tanasa.**

Donde AVT es la actividad volumétrica de tanasa en U/mL,  $C_{AGL}$  es la concentración del ácido gálico liberado en la reacción enzimática expresada en mM, FD es el factor de dilución de la muestra antes de hacer el ensayo enzimático y 0.4 es un factor que proviene del volumen de la reacción enzimática (0.125 mL) entre el tiempo de reacción (5 min) y dividido entre el volumen de muestra (0.0625 mL).

#### **6.7.4.4. Producción de tanasa extracelular en cultivos de KM71ANT en condiciones de inducción del gen heterólogo**

Para la determinar la producción de tanasa extracelular en cultivos en condiciones de inducción del gen heterólogo, se determinó la actividad enzimática volumétrica de tanasa extracelular de cultivos en BMM de una de las cepas construidas, realizando los cultivos de acuerdo al procedimiento descrito previamente (Sección 6.7.4.1). Las muestras para el análisis enzimático fueron colectadas a las 48 h de inducción. El medio

de cultivo libre de células (muestra) se diluyó 1:5 en buffer de reacción para actividad de tanasa (buffer de citratos 50 mM, pH 5.0).

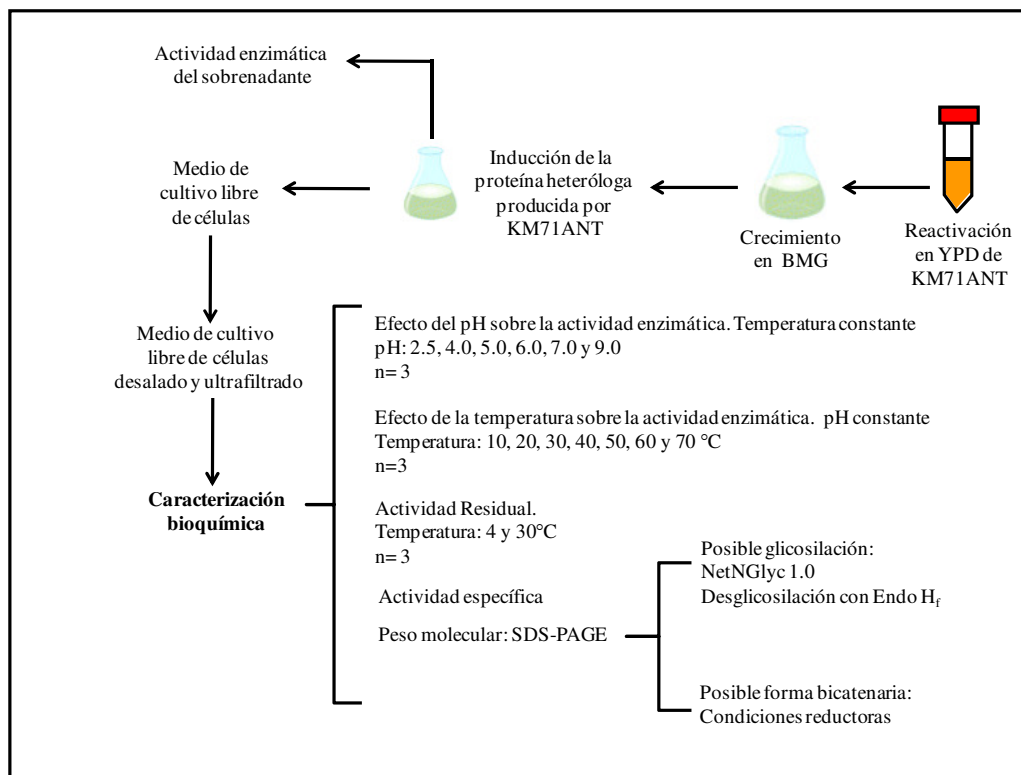
La reacción enzimática se realizó por triplicado de la siguiente manera. Todas las soluciones se pre-incubaron a 30°C durante 10 min. En un tubo de microcentrífuga de 2.0 mL se agregaron 62.5 µL de sustrato (metilgalato 10mM en buffer de citratos 50 mM, pH 5.0) y 62.5 µL de la muestra diluida previamente con buffer de reacción para actividad de tanasa (buffer de citratos 50 mM, pH 5.0) (Tabla XXVII). La mezcla de reacción (sustrato y muestra) junto con sus blancos correspondientes (Figura 11) se incubaron a 30°C por 5 min en un bloque de calentamiento (Thermomixer). El blanco de sustrato fue preparado con sustrato (metilgalato 10 mM en buffer de citratos 50 mM, pH 5.0) y buffer de reacción (buffer de citratos 50 mM, pH 5.0), mientras que el blanco de muestra fue preparado con buffer de reacción (buffer de citratos 50 mM, pH 5.0) más la muestra diluida 1:5 en buffer de actividad (buffer de citratos 50 mM, pH 5.0), como se describió en la Tabla XXIV. La reacción se detuvo añadiendo 75 µL de Rodanina metanólica (Sigma Aldrich Corporation Cat. No. 118192-25G) al 0.667% (p/v) en metanol absoluto e incubando por 5 min a 30°C. Posteriormente se adicionaron 50 µL de KOH 0.5 N (Fermont Cat. No. PQ36842) y se incubó por 5 min a 30°C. Transcurrido este tiempo, se agregó a esta mezcla 1 mL de agua ultrapura y se incubó finalmente por 10 min a 30°C. Para la determinación del ácido gálico libre se realizó una curva de calibración de acuerdo a la Tabla XXV, tanto las muestras como los estándares de calibración se incubaron a 30°C en un bloque de calentamiento (Thermomixer R, Eppendorf). Posteriormente se realizó la medición de absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro *Beckman Coulter* DU650, calibrado a cero con el primer estándar (sin ácido gálico).

## **6.8. Caracterización bioquímica de la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante**

### **6.8.1. Estrategia experimental**

La caracterización bioquímica de la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante (Figura 12) se realizó a partir de una preparación enzimática obtenida por concentración por ultrafiltración del medio de cultivo libre de células de los cultivos en condiciones de inducción del gen heterólogo. Se evaluaron los siguientes parámetros: la masa molecular

aparente, la presencia de posibles N-glicosilaciones, la presencia de una posible estructura bicatenaria de la tanasa producida, el efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática de la tanasa, la estabilidad de la enzima a 4 y 30°C, la actividad específica y los parámetros cinéticos constante de Michaelis ( $K_m$ ) y velocidad máxima ( $V_{max}$ ).



**Figura 12. Representación esquemática de la estrategia experimental para la caracterización bioquímica.** Se muestran cada una de las etapas realizadas para la caracterización bioquímica de la tanasa recombinante producida.

### 6.8.2. Concentrado enzimático de la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante

Se obtuvo una preparación enzimática mediante concentración y desalado por ultrafiltración del medio de cultivo libre de células de los cultivos en condiciones de inducción del gen heterólogo (sección 6.7.4.1) con la cepa KM71ANT. Primeramente se separaron los sobrenadantes de las células mediante centrifugación a 4000 rpm y 4°C durante 10 min. Cincuenta mL de sobrenadante se vertieron en un dispositivo de ultrafiltración (Centricon Plus-70, Millipore) y se centrifugaron a 3500 g y 4°C por 20

min. Al finalizar, el dispositivo de ultrafiltración se invirtió, se colocó en el colector de muestra y se centrifugó a 1000 g y 4°C durante 2 min obteniéndose 1 mL de concentrado, el cual fue lavado mediante 2 centrifugaciones sucesivas con 1 mL cada una de buffer de citratos 50 mM pH 5.0. El concentrado final se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

El concentrado de tanasa obtenido por ultrafiltración se caracterizó determinando la concentración de proteínas por el método de Bradford (Sección 6.7.4.2) y la actividad volumétrica de tanasa mediante la metodología descrita en la sección 6.7.4.3.

### **6.8.3. Determinación de la masa molecular aparente de la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante**

La determinación de la masa molecular aparente de la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante producida se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) siguiendo el procedimiento que se describe en la sección 6.8.5.

### **6.8.4. Presencia de posibles N-glicosilaciones en la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante**

Para determinar presencia de posibles N-glicosilaciones en la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante se evaluó el cambio de movilidad electroforética en geles de SDS-PAGE después del tratamiento de 15 µg de la tanasa recombinante con la glicosidasa endo H<sub>f</sub> (New England Biolabs). Como controles del ensayo se emplearon el concentrado enzimático de tanasa sin adicionar la endo H<sub>f</sub>, y un control adicional con todos los componentes de la reacción excepto el concentrado de tanasa, ajustando el volumen final con agua ultrapura. Inicialmente se realizó una desnaturalización de la tanasa en buffer desnaturalizante NEB y tratamiento térmico a 99°C por 10 min en un termociclador (Tabla XXVI).

**Tabla XXVI.** Reactivos empleados en la reacción de desnaturalización.

Reactivos	Volumen(μL)
Concentrado enzimático de tanasa (831.4 ng/μL de proteínas)	18.0
Buffer desnaturalizante NEB (10X)	2.0
Volumen final	20.0

Posteriormente, a la mezcla de la reacción de desnaturalización de la tanasa, así como a sus respectivos controles se agregaron los componentes necesarios para la reacción de N-desglicosilación (Tabla XXVII) y se incubaron a 37°C por 1 h en un termociclador. Finalmente los tubos con la mezcla de reacción de N-desglicosilación se almacenaron a -20°C hasta que se analizaron por SDS-PAGE (sección 6.8.5).

**Tabla XXVII.** Reactivos empleados en la reacción de N-desglicosilación.

Reactivos	Volumen (μL)
Mezcla de desnaturalización (Tabla XXVII)	16.5
Buffer de reacción G5 NEB (10X)	2.0
Endo H <sub>f</sub> NEB (1000 U/μL)	1.5
Volumen final	20.0

#### 6.8.5. Análisis de proteínas por SDS-PAGE

El ensayo de N-desglicosilación fue analizado por SDS-PAGE empleando un gel de poliacrilamida al 12% como gel separador (Sambrook *et al.*, 1989) (ver tabla XXVIII). Un volumen de 10 μL de cada una de las muestras (endo H<sub>f</sub>, y concentrado enzimático de tanasa sin tratar y tratado con endo H<sub>f</sub>) fueron incubadas con 10 μL de buffer de carga 2X (Sigma Num Cat. S3401-1VL) a 95°C por 5 min y posteriormente la mezcla total fue aplicada en el gel de poliacrilamida. Una vez colocadas las muestras en el gel, se aplicó una corriente eléctrica de 10 mA (para la fase concentradora) hasta que el colorante azul penetró en el gel separador (20-30 min). Se cambió la corriente eléctrica a 15 mA y se continuó la electroelución por 1 h. Posteriormente, el gel fue desensamblado y colocado en un recipiente de plástico conteniendo solución fijadora (metanol 50% v/v, ácido

acético 10% v/v en agua ultrapura) y permaneció en éste durante 1 h. Se retiró el gel de la solución fijadora, se tiñó con una solución colorante de Coomassie (Azul brillante de Coomassie 0.5% p/v, metanol 50% v/v, ácido acético 10% v/v, en agua ultrapura) durante 30 min, y posteriormente se transfirió a la solución decolorante (metanol 5% v/v, ácido acético 7% v/v, en agua ultrapura). El gel permaneció en esta solución toda la noche hasta que se observaron bandas azules de proteínas en un fondo claro del gel, y se tomó una fotografía digital con un sistema de fotodocumentación Kodak EDAS 290 3UV Transiluminator. El tiempo de exposición fue de 1/0.8 s. En la Tabla XXVIII se muestran los volúmenes para la realización de los geles de poliacrilamida.

**Tabla XXVIII.** Volúmenes para la realización de los geles de poliacrilamida.

<b>Solución Stock</b>	<b>Gel concentrador (μL)</b>	<b>Gel separador 12% (μL)</b>
Agua destilada	1220	2790
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	260	3120
Tris-HCl/SDS pH 6.8	500	-----
Tris-HCl/SDS pH 8.8	-----	1990
PSA 10%	10	80
TEMED	2	5
Volumen final	2000	8000

#### **6.8.6. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante**

Primeramente se prepararon los siguientes buffers: 250 mM glicina-HCl (pH 2.5), 50 mM citrato de sodio (pH 4.0, 5.0 y 6.0) y 100 mM Tris-HCl (pH 7.5 y 9.0), y se determinó el efecto del pH en la actividad enzimática de la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante empleando una dilución 1:500 del concentrado enzimático de tanasa (sección 6.8.2) con cada uno de los buffers descritos. Posteriormente, se determinó la actividad enzimática de tanasa mediante el procedimiento descrito previamente en la sección 6.7.4.3 con la diferencia que en este caso la reacción enzimática se realizó a pH 2.5, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 9.0, utilizando cada uno de los buffers preparados y una

temperatura de incubación de 30°C. El resto del procedimiento se continuó como en la tabla XXIV.

#### **6.8.7. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante**

Se determinó el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante producida en *P. pastoris* empleando una dilución 1:500 del concentrado enzimático de tanasa (sección 6.8.2) con buffer de citratos 50 mM pH 5.0 como diluyente. Se siguió el procedimiento descrito previamente en el punto 6.7.4.3 con la diferencia que en este caso la reacción enzimática se realizó a 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70°C utilizando el buffer de citratos 50 mM (pH 5.0).

#### **6.8.8. Estabilidad de la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante**

Para evaluar la estabilidad de la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante, se determinó la actividad residual de la tanasa producida en *P. pastoris* después de almacenar el concentrado enzimático de tanasa a 4 y 30°C. Primeramente, a partir del concentrado enzimático de tanasa se preparó una dilución 1:500 en buffer de citratos 50 mM (pH 5.0). A continuación se determinó la actividad volumétrica de tanasa de cada una de las muestras mediante el procedimiento descrito previamente en la sección 6.7.4.3. Enseguida las alícuotas de las diluciones se incubaron a 4 y 30°C por 120 h y se determinó la actividad enzimática de tanasa cada 24 h de incubación. Finalmente, se calculó la actividad residual de tanasa empleando la siguiente ecuación:

$$ART = \left( \frac{AVT_t}{AVT_0} \right) \cdot 100$$

**Ecuación 5. Cálculo de la actividad residual de tanasa.**

Donde ART es la actividad residual de tanasa en porcentaje,  $AVT_t$  es la actividad volumétrica de tanasa en U/mL después de incubar a 4 ó 30°C por un tiempo determinado, y  $AVT_0$  es la actividad volumétrica de tanasa inicial en U/mL.

#### **6.8.9. Determinación de la actividad específica de la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante**

Primeramente, se purificó la tanasa presente en el concentrado enzimático de tanasa (sección 6.8.2) usando el sistema de Cromatografía Biológico (BioRad, Hercules, CA), y la columna de intercambio aniónico HiTrap Q FF(GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) equilibrada con buffer A (buffer de citratos 50 mM, pH 5.0). Las proteínas fueron eluidas con buffer B(buffer de citratos 50 mM, pH 5.0, NaCl 1 M) usando un gradiente de elución escalonado (0-10 min, 100% buffer A; 10-11 min, 0-5% buffer B; 11-17 min, 5% buffer B; 17-18 min, 5-35% buffer B; 18-30 min, 35% buffer B; 30-31 min, 35-60% buffer B; 31-36 min, 60% buffer B; 36-38 min, 60-100% buffer B; y 38-43 min, 100% buffer B) a una velocidad de elución de 1 mL/min. Finalmente, se colectaron fracciones de 1.4 mL y de cada fracción se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (sección 6.7.4.2) y la actividad volumétrica de tanasa (sección 6.7.4.3).

Finalmente, el valor más alto del cociente de la actividad volumétrica de tanasa y la concentración de proteínas totales de cada una de las fracciones cromatográficas se consideró como la actividad específica de la tanasa purificada, según la ecuación que se muestra a continuación:

$$\text{Actividad específica (U/mg)} = \left( \frac{\text{AVT}}{\text{CP}} \right) \cdot 1000$$

**Ecuación 6. Cálculo de la actividad específica de la tanasa purificada.**

Donde la concentración de proteínas (CP) en una fracción cromatográfica se expresa en  $\mu\text{g}_{\text{Proteína}}/\text{mL}$  y la actividad volumétrica de tanasa (AVT) se expresa en U/mL. El factor 1000 corresponde al factor de conversión de  $\mu\text{g}$  a mg.



#### **6.8.10. Constates cinéticas de la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante**

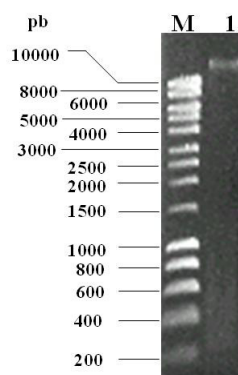
Las constantes cinéticas de la tanasa recombinante fueron determinadas mediante ensayos de actividad enzimática a 20 y 30°C usando el metilgalato como sustrato a diferentes concentraciones (0.082, 0.6, 1.32, 2.36, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 y 10.0 mM para las determinaciones a 20°C y de 0.082, 0.6, 1.32, 2.36, 5.0 mM para las determinaciones realizadas a 30°C). Los valores de actividad de tanasa fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten mediante el uso del programa DataFit 8.2.79 (Oakdale Engineering, Oakdale, PA) para determinar la constante de Michaelis ( $K_m$ ) y velocidad máxima ( $V_{max}$ ).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Determinación de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la tanasa nativa de *Aspergillus niger* GH1

#### 7.1.1. Obtención del DNA genómico para la amplificación y determinación de la secuencia nucleotídica que codifica para la tanasa de la cepa GH1 de *Aspergillus niger*

En la Figura 13 se muestra el gel de agarosa de la preparación de DNA genómico de *A. niger* GH1 requerido para la amplificación de la secuencia codificante de la tanasa de *A. niger* GH1 y posterior clonación y determinación de su secuencia nucleotídica. La presencia de única banda a un tamaño molecular mayor de 10,000 pb sin barrido confirmó la integridad del DNA genómico.

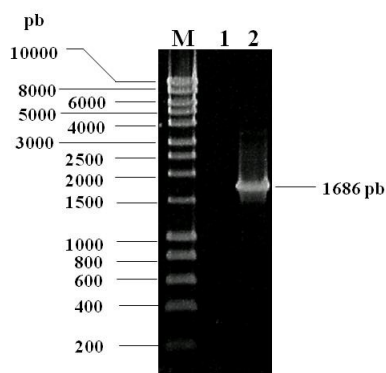


**Figura13.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X del DNA genómico aislado de la cepa de *A. niger* GH1. M: Marcador de tamaño molecular (HyperLadder I); Carril 1: DNA genómico aislado de *A. niger* GH1.

#### 7.1.2. Síntesis por PCR del fragmento *ANTGHI*

En la Figura 14 se muestra un gel de agarosa del resultado positivo de la PCR para la síntesis del fragmento *ANTGHI* realizada a partir del DNA genómico de *A. niger* GH1 y los oligonucleótidos 5'TanX y 3'TanAV. La presencia de una única banda de 1686

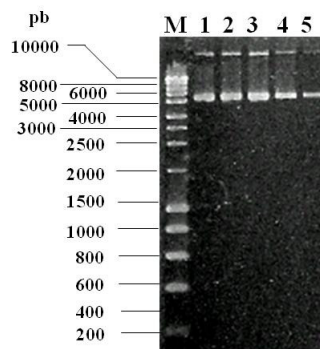
pbcorrobó el diseño correcto de los iniciadores y las condiciones del programa térmico establecidas para la síntesis del fragmento *ANTGHI*.



**Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X del producto amplificado correspondiente a la síntesis del fragmento *ANTGHI* empleando *GoTaq* DNA polimerasa. M: Marcador de tamaño molecular (HyperLadder I); Carril 1: Control negativo de la PCR (sin DNA); Carril 2: Producto amplificado de 1686 pb correspondiente al fragmento *ANTGHI* (1686 pb).**

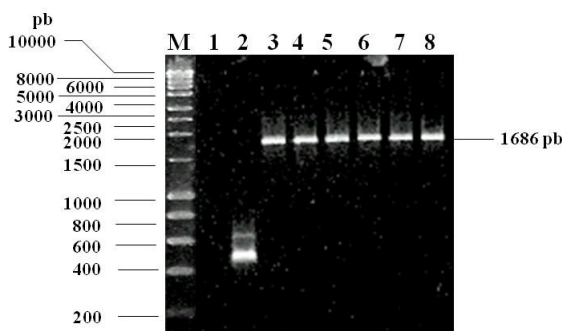
### 7.1.3. Construcción y caracterización del vector pGEM*ANTGHI*

En la transformación con el producto de ligación de pGEM con el fragmento *ANTGHI* se obtuvieron 10 colonias blancas, de las cuales de 5 colonias se extrajeron sus DNA's plasmídicos y fueron caracterizados mediante PCR. En la figura 16 se muestra un gel de agarosa al 0.8% de los DNA's plasmídicos de 5 colonias provenientes de la transformación con el producto de ligación de pGEM con el fragmento *ANTGHI* sintetizado con *GoTaq* DNA polimerasa. Claramente se pudo observar las distintas conformaciones características de los DNA's plasmídicos (pGEM*ANTGHI*) que corresponden a formas relajadas, enrolladas y superenrolladas. Así mismo también se observó su pureza en las preparaciones y la ausencia de RNA. Con cada una de estas preparaciones se llevó a cabo la caracterización mediante PCR y secuenciación.



**Figura 15.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la integridad del DNA plasmídico aislado de clonas transformadas con el producto de la ligación de el vector pGEM y el fragmento *ANTGHI*. Carril M: Marcador de tamaño molecular (HyperLadder I); Carriles 1-6: DNA plasmídico de 6 clonas obtenidas durante la transformación en *E. coli* DH5 $\alpha$ .

En la Figura 16 se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los resultados de la caracterización por PCR del DNA plasmídico de cinco colonias transformadas que deberían contener el vector pGEM*ANTGHI*, empleando los oligonucleótidos específicos para la secuencia codificante de tanasa de *A. niger* GH1 (carriles 3-8). La presencia de una banda de 1686 pb, el mismo tamaño que el control positivo del ensayo de PCR (DNA genómico de *A. niger* GH1, carril 2), confirmó la presencia del fragmento *ANTGHI* en los plásmidos de las cinco transformantes.

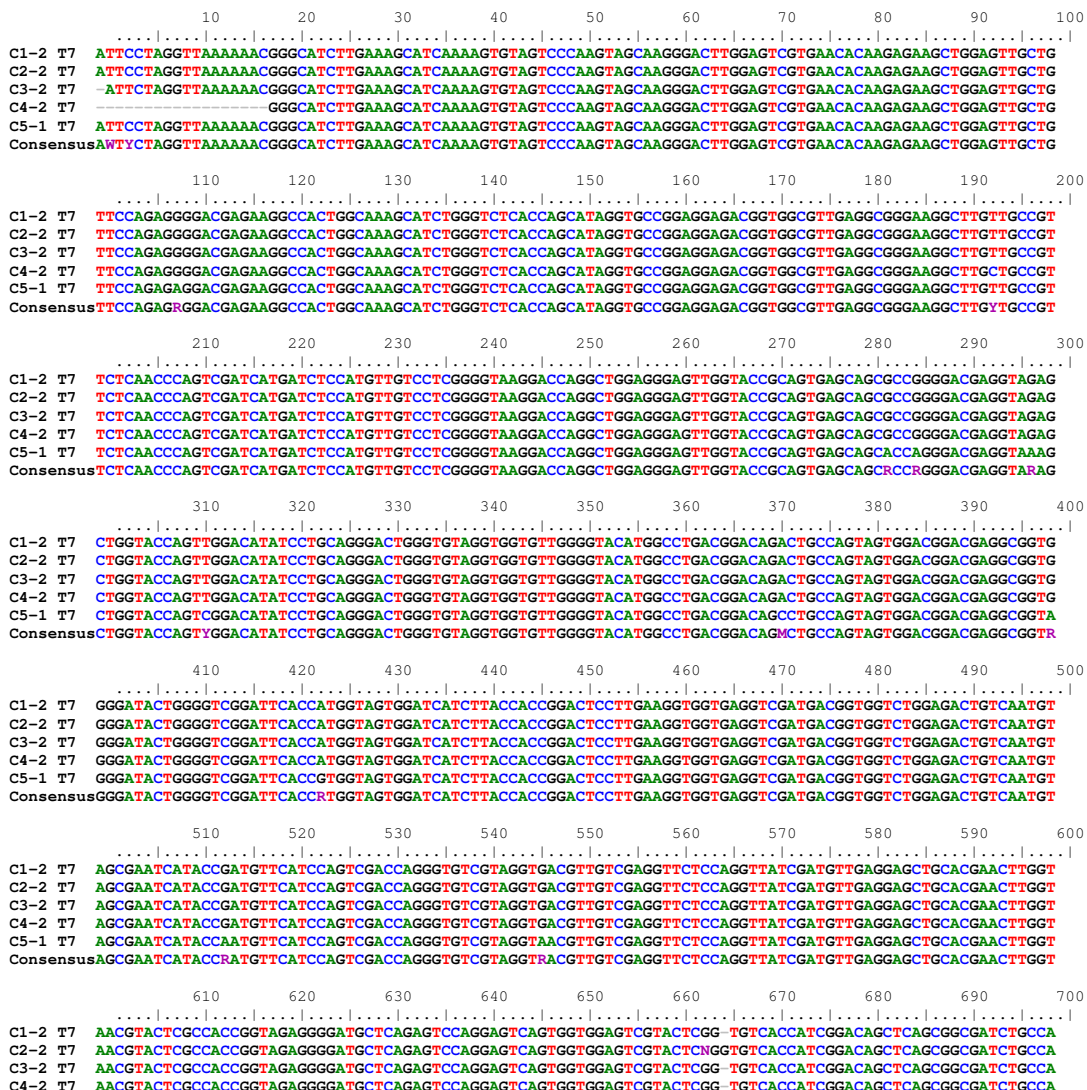


**Figura 16.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X del producto amplificado correspondiente a la síntesis del fragmento *ANTGHI* empleando *GoTaq* DNA polimerasa. Carril M: Marcador de tamaño molecular (HyperLadder I); Carril 1: Control negativo (Sin DNA); Carril 2: Control positivo I (DNAg de *A. niger* GH1 con oligos internos pertenecientes a una región conservada). Carril 3: Control positivo II (DNAg de *A. niger* GH1 con oligos usados para la clonación en pGEM). Carriles 4 a 8: DNA plasmídico de 5 colonias transformantes, donde se observan las 5 cepas positivas para la amplificación del fragmento *ANTGHI*.

Las colonias que resultaron positivas para la amplificación del fragmento *ANTGHI* se propagaron y a partir de éstas se realizaron preparaciones de DNA plasmídico en cantidad suficiente para llevar a cabo los ensayos de secuenciación.

#### 7.1.4. Secuenciación del gen que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1

En las Figuras 17 y 18 se muestra el alineamiento con las cinco secuencias obtenidas con los oligonucleótidos universales de pGEM T7 y SP6, respectivamente. Con estos alineamientos, se obtuvo una secuencia nucleotídica parcial que sirvió de molde para el diseño de los oligonucleótidos centrales 5'TanC1 y 3'TanC2 (regiones en verde y subrayadas).



C5-1 T7 CACATACTCGCCACCCTGGTAGAGGGATGCTCAGAGTCCAGGAGTCACTGGTGAATCGTACTCGG-TGTCACCATCGGACAGCTCAGCGGCGATCTGCCA  
 ConsensusMACRTACTCCACCCTGGTAGAGGGATGCTCAGAGTCCAGGAGTCACTGGTGAATCGTACTCGGGTGTCACCATCGGACAGCTCAGCGGCGATCTGCCA

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800

C1-2 T7 CGAGAGGTAAGCACGCTTGCCTTAGAGTCGTGAAGACCGCTCGTAGATGGCTGGGCGANANACACCCNTCAGCGGTGACGC  
 C2-2 T7 CGAGAGGTAAGCACGCTTGCCTTAGAGTCGTGAAGACCGCTCGTANATGGCTNNCGAGAGCACACCCCTCAGCGGTGACGCTGCGGTCTCGG-----  
 C3-2 T7 CGAGAGGTAAGCACGCTTGCCTTAGAGTCGTGAAGACCGCTCGTAGATGGCTGGGCGANANACACCCCTCANCGGTGNNCTGCGC  
 C4-2 T7 CGAGAGGTAAGCACGCTTGCCTTAGAGTCGTGAAGACCGCTCGTAGATGGCTGGGCGAGANACACCC-TCAGCGGTGANNCTGCGCTTCGGGCGGNN  
 C5-1 T7 CGAGAGGTAAGCACGCTTGCCTTAGAGTCGTGAAGACCGCTCGTAGATGGCTGGGCGAGAGCACACCCCTCAGCGGTGACNCTGC-----  
 ConsensusCGAGAGGTARGCACGCTTGCCTTAGAGTGTGAAGACCGCTCGTAGATGGCTGGGCGAGAGCACACCCCTCAGCGGTGACGCTGCGCTTCGGGCGGNN

810

C1-2 T7 -----  
 C2-2 T7 -----  
 C3-2 T7 -----  
 C4-2 T7 GGTAGCTAGTANNCTGN  
 C5-1 T7 -----  
 ConsensusGGTAGCTAGTANNCTGN

Figura 17. Alineamiento de las cinco secuencias obtenidas con el oligonucleótido T7. En verde se muestra la secuencia del oligonucleótido 5'TanC1.

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

c1-2 SP6 ANNNNNAAGCTNTGATCCAAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCGCACTAGTGATTGCCCTCGAGAAAAGAACTTCCCTGTC  
 C2-2 SP6 -NANNNANGCTATGCTNTCCA-CGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCGCACTAGTGATTGCCCTCGAGAAAAGAACTTCCCTGTC  
 C3-2 SP6 -AANTNNNGCTATGCAATCCN-CGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCGCACTAGTGATTGCCCTCGAGAAAAGAACTTCCCTGTC  
 C4-2 SP6 NNNNNNNNGCTNTGCAATCCN-CGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCGCACTAGTGATTGCCCTCGAGAAAAGAACTTCCCTGTC  
 c5-1 sp6 -NNANNNGGCTATGCAATCCN-CGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCGCACTAGTGATTGCCCTCGAGAAAAGAACTTCCCTGTC  
 ConsensusANAAANTARGCTATGCAATCCAAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCGCACTAGTGATTGCCCTCGAGAAAAGAACTTCCCTGTC

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

c1-2 SP6 CGATCTCTGCACGTGTTTCCAATGTTTCAGTCCGCGCTTCTTCCAAACGGCACCCCTCTGGGAATCAACTTGATCCCTCCGCGTCACGTGCAACACCGTC  
 C2-2 SP6 CGATCTCTGCACGTGTTTCCAATGTTTCAGTCCGCGCTTCTTCCAAACGGCACCCCTCTGGGAATCAACTTGATCCCTCCGCGTCACGTGCAACACCGTC  
 C3-2 SP6 CGATCTCTGCACGTGTTTCCAATGTTTCAGTCCGCGCTTCTTCCAAACGGCACCCCTCTGGGAATCAACTTGATCCCTCCGCGTCACGTGCAACACCGTC  
 C4-2 SP6 CGATCTCTGCACGTGTTTCCAATGTTTCAGTCCGCGCTTCTTCCAAACGGCACCCCTCTGGGAATCAACTTGATCCCTCCGCGTCACGTGCAACACCGTC  
 c5-1 sp6 CGATCTCTGCACGTGTTTCCAATGTTTCAGTCCGCGCTTCTTCCAAACGGCACCCCTCTGGGAATCAACTTGATCCCTCCGCGTCACGTGCAACACCGTC  
 ConsensusCGATCTCTGCACGTGTTTCCAATGTTTCAGTCCGCGCTTCTTCCAAACGGCACCCCTCTGGGAATCAACTTGATCCCTCCGCGTCACGTGCAACACCGTC

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

c1-2 SP6 ACCGATGCCAGCTCTGGCATGGGTAGCTCCGGCTCCTACGACTACTGCAATGTCACTGTTACCTACACCCACACCGGGAAGGGTGACAAGGTTGTCGTGA  
 C2-2 SP6 ACCGATGCCAGCTCTGGCATGGGTAGCTCCGGCTCCTACGACTACTGCAATGTCACTGTTACCTACACCCACACCGGGAAGGGTGACAAGGTTGTCGTGA  
 C3-2 SP6 ACCGATGCCAGCTCTGGCATGGGTAGCTCCGGCTCCTACGACTACTGCAATGTCACTGTTACCTACACCCACACCGGGAAGGGTGACAAGGTTGTCGTGA  
 C4-2 SP6 ACCGATGCCAGCTCTGGCATGGGTAGCTCCGGCTCCTACGACTACTGCAATGTCACTGTTACCTACACCCACACCGGGAAGGGTGACAAGGTTGTCGTGA  
 c5-1 sp6 ACCGATGCCAGCTCTGGCATGGGTAGCTCCGGCTCCTACGACTACTGCAATGTCACTGTTACCTACACCCACACCGGGAAGGGTGACAAGGTTGTCGTGA  
 ConsensusACCGATGCCAGCTCTGGCATGGGTAGCTCCGGCTCCTACGACTACTGCAATGTCACTGTTACCTACACCCACACCGGGAAGGGTGACAAGGTTGTCGTGA

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

c1-2 SP6 AGTACGCCCTCGCCGCTCCTTCCGACTTCAAGAACCGTTTCTACGTTGCCGGTGGTGGTGGTTTCTCCCTGTCCAGCGATGCTACTGGCGGTCTCGAGTA  
 C2-2 SP6 AGTACGCCCTCGCCGCTCCTTCCGACTTCAAGAACCGTTTCTACGTTGCCGGTGGTGGTGGTTTCTCCCTGTCCAGCGATGCTACTGGCGGTCTCGAGTA  
 C3-2 SP6 AGTACGCCCTCGCCGCTCCTTCCGACTTCAAGAACCGTTTCTACGTTGCCGGTGGTGGTGGTTTCTCCCTGTCCAGCGATGCTACTGGCGGTCTCGAGTA  
 C4-2 SP6 AGTACGCCCTCGCCGCTCCTTCCGACTTCAAGAACCGTTTCTACGTTGCCGGTGGTGGTGGTTTCTCCCTGTCCAGCGATGCTACTGGCGGTCTCGAGTA  
 c5-1 sp6 AGTACGCCCTCGCCGCTCCTTCCGACTTCAAGAACCGTTTCTACGTTGCCGGTGGTGGTGGTTTCTCTCTGTCCAGCGATGCTACTGGCGGTCTCGAGTA  
 ConsensusAGTACGCCCTCGCCGCTCCTTCCGACTTCAAGAACCGTTTCTACGTTGCCGGTGGTGGTGGTTTCTCTCTGTCCAGCGATGCTACTGGCGGTCTCGAGTA

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

c1-2 SP6 CCGTGCTGCCTCCGGCGCCACCGACGCGGGCTACGACGCTTCTCCTACAGCTATGATGAAGTCGTCTCTACAGCAACGGCTCGATCAACTGGGATGCT  
 C2-2 SP6 CCGTGCTGCCTCCGGCGCCACCGACGCGGGCTACGACGCTTCTCCTACAGCTATGATGAAGTCGTCTCTACGGCAACGGCTCGATCAACTGGGATGCT  
 C3-2 SP6 CCGTGCTGCCTCCGGCGCCACCGACGCGGGCTACGACGCTTCTCCTACAGCTATGATGAAGTCGTCTCTACGGCAACGGCTCGATCAACTGGGATGCT  
 C4-2 SP6 CCGTGCTGCCTCCGGCGCCACCGACGCGGGCTACGACGCTTCTCCTACAGCTATGATGAAGTCGTCTCTACGGCAACGGCTCGATCAACTGGGATGCT  
 c5-1 sp6 CCGTGCTGCCTCCGGTGCCACCGACGCGGGCTACGACGCTTCTCCTACAGCTATGATGAAGTCGTCTCTACGGCAACGGCTCGATCAACTGGGATGCT  
 ConsensusCCGTGCTGCCTCCGGYGCCACCGACGCGGGCTACGACGCTTCTCCTACAGCTATGATGAAGTCGTCTCTACRCAACGGCTCGATCAACTGGGATGCT

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

c1-2 SP6 ACTTACATGTTCTCTACAGGCTCTTGGTGAATGACCAAGATCGCCAAAGCCCTGACCCGTGGTTTCTACGGTCTCTCCAGCGACAAGAAGATCTACA  
 C2-2 SP6 ACTTACATGTTCTCTACAGGCTCTTGGTGAATGACCAAGATCGCCAAAGCCCTGACCCGTGGTTTCTACGGTCTCTCCAGCGACAAGAAGATCTACA  
 C3-2 SP6 ACTTACATGTTCTCTACAGGCTCTTGGTGAATGACCAAGATCGCCAAAGCCCTGACCCGTGGTTTCTACGGTCTCTCCAGCGACAAGAAGATCTACA  
 C4-2 SP6 ACTTACATGTTCTCTACAGGCTCTTGGTGAATGACCAAGATCGCCAAAGCCCTGACCCGTGGTTTCTACGGTCTCTCCAGCGACAAGAAGATCTACA  
 c5-1 sp6 ACTTACATGTTCTCTACAGGCTCTTGGTGAATGACCAAGATCGCCAAAGCCCTGACCCGTGGTTTCTACGGTCTCTCCAGCGACAAGAAGATCTACA  
 ConsensusACTTACATGTTCTCTACAGGCTCTTGGTGAATGACCAAGATCGCCAAAGCCCTGACCCGTGGTTTCTACGGTCTCTCCAGCGACAAGAAGATCTACA

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700

c1-2 SP6 CTTACTACGAGGGCTGTTCCGATGGTGGTCTGAGGGATGAGTCAGGTCAGGTCAGGCGCTGGGGAGATGAATATGACGGTGTCTATTGCCGTGCCCTGCGCTT  
 C2-2 SP6 CTTACTACGAGGGCTGTTCCGATGGTGGTCTGAGGGATGAGTCAGGTCAGGTCAGGCGCTGGGGAGATGAATATGACGGTGTCTATTGCCGTGCCCTGCGCTT  
 C3-2 SP6 CTTACTACGAGGGCTGTTCCGATGGTGGTCTGAGGGATGAGTCAGGTCAGGTCAGGCGCTGGGGAGATGAATATGACGGTGTCTATTGCCGTGCCCTGCGCTT  
 C4-2 SP6 CTTACTACGAGGGCTGTTCCGATGGTGGTCTGAGGGATGAGTCAGGTCAGGTCAGGCGCTGGGGAGATGAATATGACGGTGTCTATTGCCGTGCCCTGCGCTT  
 c5-1 sp6 CTTACTACGAGGGCTGTTCCGATGGTGGTCTGAGGGATGAGTCAGGTCAGGTCAGGCGCTGGGGAGATGAATATGACGGTGTCTATTGCCGTGCCCTGCGCTT  
 ConsensusCTTACTACGAGGGCTGTTCCGATGGTGGTCTGAGGGATGAGTCAGGTCAGGTCAGGCGCTGGGGAGATGAATATGACGGTGTCTATTGCCGTGCCCTGCGCTT

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800

c1-2 SP6 CCGCTTTGCTCANAGCNGNCCACCAGCTTCTCCCTGCCACTATTGAACACACCATGNNNTACTACCCCTCCCCCTT-GCGAAGCTGANANNATCGTCAAC

```

C2-2 SP6 CCGCTTTGCTCAGCAGCNGNCCACCACGTCTTCCCTGCCACTATTGAACACACCATGGACTACTACCCCTCCCCCTTGCAGACTTGACAAGATCGTCNAC
C3-2 SP6 CCGCTTTGCTCAGCAGCNGNCCACCACGTCTTCCCTGCCACTATTGAACACACCATGNACTACTACCCCTCCCCCTTGCAGACTTGACNAGATCGTCAAC
C4-2 SP6 CCGCTTTGCTCAGCAGCNGNCCACCACGTCTTCCCTGCCACTATTGAACACACCATGGNNTACTACCCCTCCCCCTTGCNAACTTGANANNATCGTCAAC
c5-1 sp6 CCNCTTTGCTCANNNN--NGTNACCACGTCTTCCCTGCCANNAT--GACACAC-ATGGACTACTACCCCTCCCCCTTG--NNACTTGANA-GATC-TCAAC
Consensus CCGCTTTGCTCAGCAGCNGTYCACGAGCTTCCCTGACAGAGTGRACACACCATGGACTACTACCCCTCCCCYTKTGCAGACTTGACAAGATCGTCAAC

```

810      820      830      840

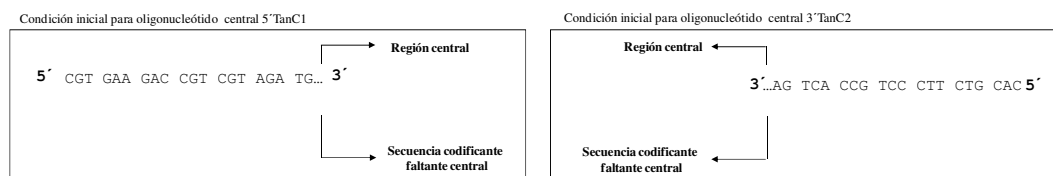
```

c1-2 SP6 GCTACCATCGAAGCCTGTGACC-TCTCGANGGCC-----
C2-2 SP6 GCTACCATCGAAGCCTGTGANCCTCTCGACGGCCGTANCGATGGCGN--
C3-2 SP6 GCTACCATCGAAGCCTGTGACCCTCTCGACGGCCGTACCGATGGCG--
C4-2 SP6 GCTACCATCGAAGCCTGTGACC-TCTCNACGGCCGTACNATG-----
c5-1 sp6 NN-----ACCTNANCCTGTGACC-TCTCNACG-CCGTANNNGGNNNGTTC
Consensus GCTACCA YCKAAGCCTGTGACCCTCTCGACGGCCGTACCRDKGGCGTTC

```

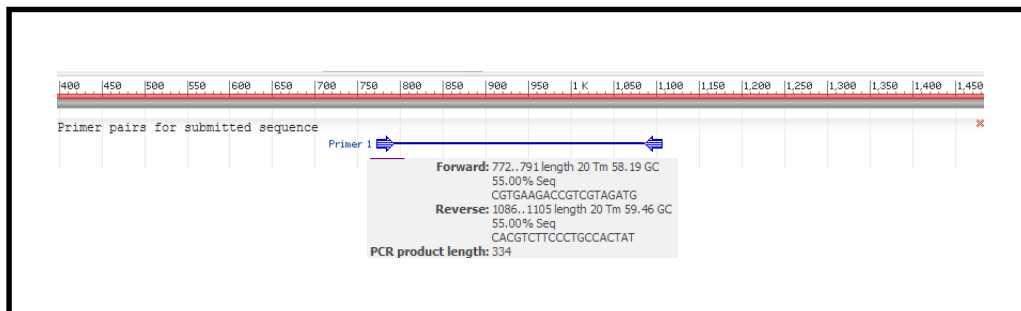
**Figura 18. Alineamiento de las cinco secuencias obtenidas con el oligonucleótido SP6.** En verde se muestra la secuencia del oligonucleótido 3'TanC2.

La secuencia de los iniciadores centrales diseñados para secuenciar la parte central del gen de la tanasa de *A. niger* GH1, así como los diferentes elementos de éstos, se muestran en la figura 19. En la parte inferior se presenta la secuencia del iniciador 5'TanC1 de 20 nucleótidos, y en la parte superior se muestra el iniciador 3'TanC2 de 20 nucleótidos. La verificación del diseño de los iniciadores centrales se realizó mediante una simulación de la PCR con la plataforma primer BLAST (Figura 20), teniendo como secuencia molde la secuencia parcial codificante para la tanasa de *A. niger* GH1 obtenida mediante secuenciación con los iniciadores T7 y SP6 de pGEM. Esta simulación de la PCR con los oligonucleótidos 5'TanC1 y 3'TanC2 dio lugar a una única banda de 334 pb correspondiente a la secuencia nucleotídica central faltante de la tanasa de *A. niger* GH1. El programa no señaló la presencia de bandas inespecíficas.

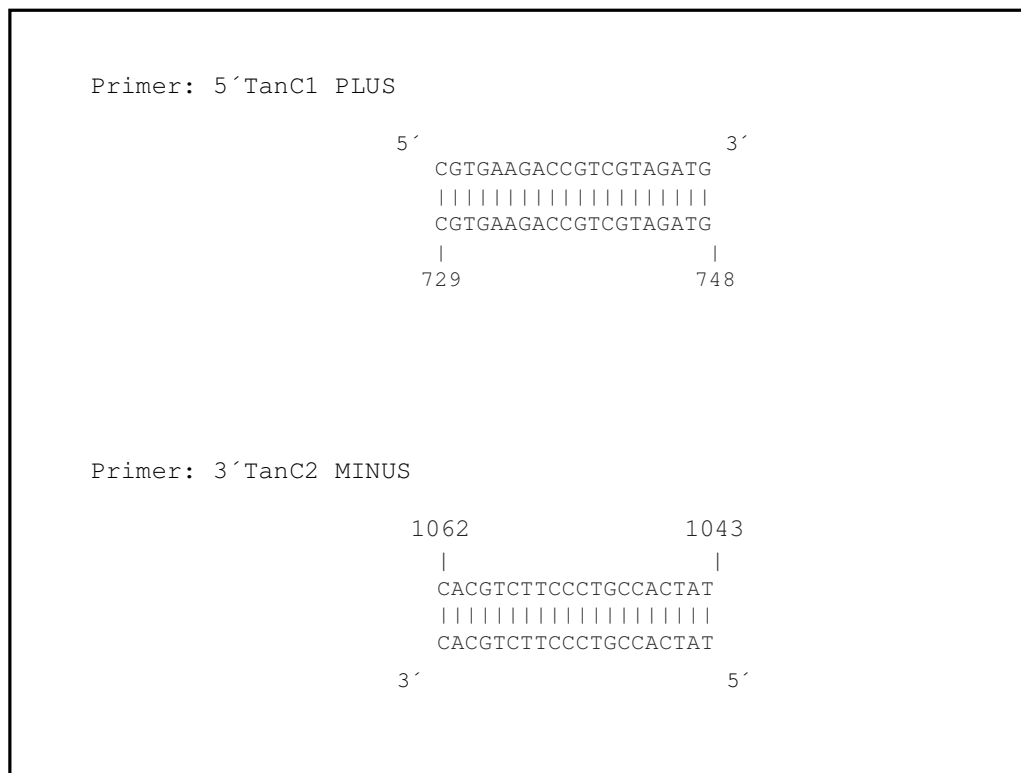


**Figura 19. Secuencia de los iniciadores necesarios para amplificar la región central.** En la parte izquierda se muestra la secuencia del iniciador 5'TanC1, en la parte derecha se muestra el iniciador 3'TanC2.

Como resultado del estudio en Primer BLAST, se obtuvo la figura 21 donde se muestra la posición de los nucleótidos del iniciador 5'TanC1 que hibridan con la secuencia blanco (Plus), y la posición de los nucleótidos del iniciador 3'TanC2 que hibridan con la secuencia blanco (Minus).



**Figura 20. Simulación de la PCR mediante la plataforma Primer BLAST.** Como datos de entrada se emplearon los iniciadores centrales diseñados y la secuencia parcial del gen que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1. Las flechas representan los iniciadores 5'TanC1 y 3'TanC2. La línea azul representa el producto amplificado perteneciente al fragmento *ANTGH1* central de 334 pb.

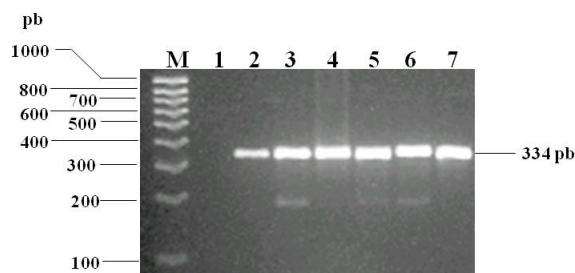


**Figura 21. Identidad de los iniciadores con la secuencia molde.** El esquema de estas identidades se obtuvo al realizar el análisis de los iniciadores mediante la plataforma primer BLAST.

En la Figura 22 se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de la verificación del buen diseño de los oligonucleótidos centrales (5'TanC1 y 3'TanC2), la cual se llevó a cabo mediante ensayos de PCR con estos oligonucleótidos y el DNA plasmídico de 5 colonias transformadas. La presencia de una banda de 334 pb, el mismo



tamaño que el control positivo del ensayo de PCR (DNA genómico de *A. niger*, carril 2), confirmó el buen diseño de estos oligonucleótidos, por lo que se procedió a secuenciar con estos oligonucleótidos 4 plásmidos provenientes de diferentes colonias para obtener la secuencia nucleotídica completa de la tanasa de *A. niger* GH1 (Figura 22).



**Figura 22.** Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en TBE 1X de la caracterización por PCR del vector pGEMANTGHI con los oligonucleótidos centrales diseñados a partir de la secuencia parcial obtenida. Carril M: Marcador de tamaño molecular (HyperLadder IV); Carril 1: Control negativo (Sin DNA). Carril 2: Control positivo (DNAg de *A. niger* GH1 con oligos centrales diseñados en base a la secuencia parcial obtenida. Carriles 3 a 7: DNA plasmídico de 5 colonias transformantes, donde se observan las 5 cepas positivas para la amplificación del fragmento ANTGHI.

En la Figura 23 se muestra el alineamiento realizado con el módulo CAP del programa *BioEdit* entre las secuencias nucleotídicas obtenidas por secuenciación del plásmido pGEMANTGHI con los iniciadores universales T7 y SP6, y los oligonucleótidos centrales (5'TanC1y 3'TanC2). Además se muestra la secuencia *contig* de este alineamiento que corresponde a la secuencia nucleotídica de ANTGHI. La traducción del primer marco de lectura de la secuencia complementaria reversa (marco de lectura -1) de ANTGHI mostró alta identidad con otras tanasas fúngicas, por lo que esta secuencia complementaria reversa se consideró como la secuencia nucleotídica de la tanasa de *A. niger* GH1 madura, la cual tuvo una longitud 1686 pb sin intrones y codifica para una proteína de 562 aminoácidos. Esta secuencia nucleotídica se registró en la base de datos GenBank con la clave de acceso KP273835.

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
cap_C2-2 T7 863 ba+ATTCCTAGGTTAAAAACGGGCATCTTGAAAGCATCAAAAGTGTAGTCCCAAGTAGCAAGGGACTTGGAGTCGTGAACACAAGAGAAGCTGGAGTTGCTG
cap_C3-2 T7 863 ba+ATTC TAGGTTAAAAACGGGCATCTTGAAAGCATCAAAAGTGTAGTCCCAAGTAGCAAGGGACTTGGAGTCGTGAACACAAGAGAAGCTGGAGTTGCTG
cap_C5-1 T7 863 ba+ATTCCTAGGTTAAAAACGGGCATCTTGAAAGCATCAAAAGTGTAGTCCCAAGTAGCAAGGGACTTGGAGTCGTGAACACAAGAGAAGCTGGAGTTGCTG
cap_C1-2 T7 863 ba+ATTCCTAGGTTAAAAACGGGCATCTTGAAAGCATCAAAAGTGTAGTCCCAAGTAGCAAGGGACTTGGAGTCGTGAACACAAGAGAAGCTGGAGTTGCTG
cap_C4-2 T7 863 ba+.....GGGCATCTTGAAAGCATCAAAAGTGTAGTCCCAAGTAGCAAGGGACTTGGAGTCGTGAACACAAGAGAAGCTGGAGTTGCTG
cap_C4-2 TanC1 863+.....
cap_C2-2 TanC2 863-.....
cap_C1-2 TanC2 863-.....

```

cap\_C4-2 TanC2 863-  
cap\_C3-2 TanC2 863-  
cap\_C3-2 TanC1 863+  
cap\_C1-2 TanC1 863+  
cap\_C2-2 TanC1 863+  
cap\_C2-2 SP6 863 b-  
cap\_C3-2 SP6 863 b-  
cap\_C5-1 SP6 863 b-  
cap\_C4-2 SP6 863 b-  
cap\_C1-2 SP6 863 -  
Contig-0 ATTCCCTAGGTTAAAAAACGGGCATCTTGAAGCATCAAAGTGTAGTCCCAAGTAGCAAGGGACTTGGAGTCGTGAACACAAGAGAAGCTGGAGTTGCTG

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

cap\_C2-2 T7 863 ba+TTCCAGAGGGGACGAGAAGGCCACTGGCAAAGCATCTGGGCTCTACCAGCATAGGTGCCGGAGGAGACGGTGGCGTTGAGGCGGGAAGGCTTGTTCGCGT  
cap\_C3-2 T7 863 ba+TTCCAGAGGGGACGAGAAGGCCACTGGCAAAGCATCTGGGCTCTACCAGCATAGGTGCCGGAGGAGACGGTGGCGTTGAGGCGGGAAGGCTTGTTCGCGT  
cap\_C5-1 T7 863 ba+TTCCAGAGGGGACGAGAAGGCCACTGGCAAAGCATCTGGGCTCTACCAGCATAGGTGCCGGAGGAGACGGTGGCGTTGAGGCGGGAAGGCTTGTTCGCGT  
cap\_C1-2 T7 863 ba+TTCCAGAGGGGACGAGAAGGCCACTGGCAAAGCATCTGGGCTCTACCAGCATAGGTGCCGGAGGAGACGGTGGCGTTGAGGCGGGAAGGCTTGTTCGCGT  
cap\_C4-2 T7 863 ba+TTCCAGAGGGGACGAGAAGGCCACTGGCAAAGCATCTGGGCTCTACCAGCATAGGTGCCGGAGGAGACGGTGGCGTTGAGGCGGGAAGGCTTGTTCGCGT  
cap\_C4-2 TanC1 863+  
cap\_C2-2 TanC2 863-  
cap\_C1-2 TanC2 863-  
cap\_C4-2 TanC2 863-  
cap\_C3-2 TanC2 863-  
cap\_C3-2 TanC1 863+  
cap\_C1-2 TanC1 863+  
cap\_C2-2 TanC1 863+  
cap\_C2-2 SP6 863 b-  
cap\_C3-2 SP6 863 b-  
cap\_C5-1 SP6 863 b-  
cap\_C4-2 SP6 863 b-  
cap\_C1-2 SP6 863 -  
Contig-0 TTCCAGAGGGGACGAGAAGGCCACTGGCAAAGCATCTGGGCTCTACCAGCATAGGTGCCGGAGGAGACGGTGGCGTTGAGGCGGGAAGGCTTGTTCGCGT

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

cap\_C2-2 T7 863 ba+TCTCAACCCAGTCGATCATGATCTCCATGTTGTC CTCGGGGTAAGGACCAGGCTGGAGGGAGTTGGTACCAGTCAGCAGCGCCGGGGACGAGGTAGA  
cap\_C3-2 T7 863 ba+TCTCAACCCAGTCGATCATGATCTCCATGTTGTC CTCGGGGTAAGGACCAGGCTGGAGGGAGTTGGTACCAGTCAGCAGCGCCGGGGACGAGGTAGA  
cap\_C5-1 T7 863 ba+TCTCAACCCAGTCGATCATGATCTCCATGTTGTC CTCGGGGTAAGGACCAGGCTGGAGGGAGTTGGTACCAGTCAGCAGCGCCGGGGACGAGGTAGA  
cap\_C1-2 T7 863 ba+TCTCAACCCAGTCGATCATGATCTCCATGTTGTC CTCGGGGTAAGGACCAGGCTGGAGGGAGTTGGTACCAGTCAGCAGCGCCGGGGACGAGGTAGA  
cap\_C4-2 T7 863 ba+TCTCAACCCAGTCGATCATGATCTCCATGTTGTC CTCGGGGTAAGGACCAGGCTGGAGGGAGTTGGTACCAGTCAGCAGCGCCGGGGACGAGGTAGA  
cap\_C4-2 TanC1 863+  
cap\_C2-2 TanC2 863-  
cap\_C1-2 TanC2 863-  
cap\_C4-2 TanC2 863-  
cap\_C3-2 TanC2 863-  
cap\_C3-2 TanC1 863+  
cap\_C1-2 TanC1 863+  
cap\_C2-2 TanC1 863+  
cap\_C2-2 SP6 863 b-  
cap\_C3-2 SP6 863 b-  
cap\_C5-1 SP6 863 b-  
cap\_C4-2 SP6 863 b-  
cap\_C1-2 SP6 863 -  
Contig-0 TCTCAACCCAGTCGATCATGATCTCCATGTTGTC CTCGGGGTAAGGACCAGGCTGGAGGGAGTTGGTACCAGTCAGCAGCGCCGGGGACGAGGTAGA

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

cap\_C2-2 T7 863 ba+GCTGGTACCAGTTGGACATATCCTGCAGGGACTGGGTGTAGGTGGTGTGGGGTACATGGCCCTGACGGAACAGACTGCCAGTAGTGGACGGACGAGGCGGT  
cap\_C3-2 T7 863 ba+GCTGGTACCAGTTGGACATATCCTGCAGGGACTGGGTGTAGGTGGTGTGGGGTACATGGCCCTGACGGAACAGACTGCCAGTAGTGGACGGACGAGGCGGT  
cap\_C5-1 T7 863 ba+GCTGGTACCAGTTGGACATATCCTGCAGGGACTGGGTGTAGGTGGTGTGGGGTACATGGCCCTGACGGAACAGACTGCCAGTAGTGGACGGACGAGGCGGT  
cap\_C1-2 T7 863 ba+GCTGGTACCAGTTGGACATATCCTGCAGGGACTGGGTGTAGGTGGTGTGGGGTACATGGCCCTGACGGAACAGACTGCCAGTAGTGGACGGACGAGGCGGT  
cap\_C4-2 T7 863 ba+GCTGGTACCAGTTGGACATATCCTGCAGGGACTGGGTGTAGGTGGTGTGGGGTACATGGCCCTGACGGAACAGACTGCCAGTAGTGGACGGACGAGGCGGT  
cap\_C4-2 TanC1 863+  
cap\_C2-2 TanC2 863-  
cap\_C1-2 TanC2 863-  
cap\_C4-2 TanC2 863-  
cap\_C3-2 TanC2 863-  
cap\_C3-2 TanC1 863+  
cap\_C1-2 TanC1 863+  
cap\_C2-2 TanC1 863+  
cap\_C2-2 SP6 863 b-  
cap\_C3-2 SP6 863 b-  
cap\_C5-1 SP6 863 b-  
cap\_C4-2 SP6 863 b-  
cap\_C1-2 SP6 863 -  
Contig-0 GCTGGTACCAGTTGGACATATCCTGCAGGGACTGGGTGTAGGTGGTGTGGGGTACATGGCCCTGACGGAACAGACTGCCAGTAGTGGACGGACGAGGCGGT

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

cap\_C2-2 T7 863 ba+GGGGA TACTGGGGTCGGATTCCACATGGTAGTGGATCATCTTACCACCGGACTCCTTGAAGGTGGTGAGGTCGATGACGGTGGTCTGGAGACTGTCAATG  
cap\_C3-2 T7 863 ba+GGGGA TACTGGGGTCGGATTCCACATGGTAGTGGATCATCTTACCACCGGACTCCTTGAAGGTGGTGAGGTCGATGACGGTGGTCTGGAGACTGTCAATG  
cap\_C5-1 T7 863 ba+GGGGA TACTGGGGTCGGATTCCACATGGTAGTGGATCATCTTACCACCGGACTCCTTGAAGGTGGTGAGGTCGATGACGGTGGTCTGGAGACTGTCAATG  
cap\_C1-2 T7 863 ba+GGGGA TACTGGGGTCGGATTCCACATGGTAGTGGATCATCTTACCACCGGACTCCTTGAAGGTGGTGAGGTCGATGACGGTGGTCTGGAGACTGTCAATG  
cap\_C4-2 T7 863 ba+GGGGA TACTGGGGTCGGATTCCACATGGTAGTGGATCATCTTACCACCGGACTCCTTGAAGGTGGTGAGGTCGATGACGGTGGTCTGGAGACTGTCAATG  
cap\_C4-2 TanC1 863+  
cap\_C2-2 TanC2 863-  
cap\_C1-2 TanC2 863-  
cap\_C4-2 TanC2 863-  
cap\_C3-2 TanC2 863-  
cap\_C3-2 TanC1 863+  
cap\_C1-2 TanC1 863+  
cap\_C2-2 TanC1 863+  
cap\_C2-2 SP6 863 b-  
cap\_C3-2 SP6 863 b-  
cap\_C5-1 SP6 863 b-  
cap\_C4-2 SP6 863 b-  
cap\_C1-2 SP6 863 -  
Contig-0 GGGGA TACTGGGGTCGGATTCCACATGGTAGTGGATCATCTTACCACCGGACTCCTTGAAGGTGGTGAGGTCGATGACGGTGGTCTGGAGACTGTCAATG

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

cap\_C2-2 T7 863 ba+TAGCGAATCATACCGATGTTATCCAGTCGACAGGGGTGCTGAGGTGACGTTGTGAGGTCTCTCAGGTTATCGATGTTGAGGAGCTGCACGAACCTGG  
cap\_C3-2 T7 863 ba+TAGCGAATCATACCGATGTTATCCAGTCGACAGGGGTGCTGAGGTGACGTTGTGAGGTCTCTCAGGTTATCGATGTTGAGGAGCTGCACGAACCTGG

cap\_C5-1 T7 863 ba+TAGCGAATCATACCAATGTTATCCAGTCGACCAGGGTGTCTGAGGTAGCTTGTCTCAGGTTATCGATGTTAGGAGCTGCACGAACCTGG

cap\_C1-2 T7 863 ba+TAGCGAATCATACCGATGTTATCCAGTCGACCAGGGTGTCTGAGGTAGCTTGTCTCAGGTTATCGATGTTAGGAGCTGCACGAACCTGG

cap\_C4-2 T7 863 ba+TAGCGAATCATACCGATGTTATCCAGTCGACCAGGGTGTCTGAGGTAGCTTGTCTCAGGTTATCGATGTTAGGAGCTGCACGAACCTGG

cap\_C4-2 TanC1 863+

cap\_C2-2 TanC2 863-TAGCGAATCATACCGATGTTATCCAGTCGACCAGGGTGTCTGAGGTAGCTTGTCTCAGGTTATCGATGTTAGGAGCTGCACGAACCTGG

cap\_C1-2 TanC2 863-TAGCGAATCATACCGATGTTATCCAGTCGACCAGGGTGTCTGAGGTAGCTTGTCTCAGGTTATCGATGTTAGGAGCTGCACGAACCTGG

cap\_C4-2 TanC2 863-TAGCGAATCATACCGATGTTATCCAGTCGACCAGGGTGTCTGAGGTAGCTTGTCTCAGGTTATCGATGTTAGGAGCTGCACGAACCTGG

cap\_C3-2 TanC2 863-TAGCGAATCATACCGATGTTATCCAGTCGACCAGGGTGTCTGAGGTAGCTTGTCTCAGGTTATCGATGTTAGGAGCTGCACGAACCTGG

cap\_C3-2 TanC1 863+

cap\_C1-2 TanC1 863+

cap\_C2-2 TanC1 863+

cap\_C2-2 SP6 863 b-

cap\_C3-2 SP6 863 b-

cap\_C5-1 SP6 863 b-

cap\_C4-2 SP6 863 b-

cap\_C1-2 SP6 863 -

Contig-0 TAGCGAATCATACCGATGTTATCCAGTCGACCAGGGTGTCTGAGGTAGCTTGTCTCAGGTTATCGATGTTAGGAGCTGCACGAACCTGG

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700

cap\_C2-2 T7 863 ba+TAACGTACTCGCCACCGGTAGAGGGGATGCTCAGAGTCGAGGAGTCAGTGGTGGAGTCGTACTCNGGTGTACCATCGGACAGCTCAGCGGGCATCTGCC

cap\_C3-2 T7 863 ba+TAACGTACTCGCCACCGGTAGAGGGGATGCTCAGAGTCGAGGAGTCAGTGGTGGAGTCGTACTC GGTGTACCATCGGACAGCTCAGCGGGCATCTGCC

cap\_C5-1 T7 863 ba+TAACGTACTCGCCACCGGTAGAGGGGATGCTCAGAGTCGAGGAGTCAGTGGTGGAGTCGTACTC GGTGTACCATCGGACAGCTCAGCGGGCATCTGCC

cap\_C1-2 T7 863 ba+TAACGTACTCGCCACCGGTAGAGGGGATGCTCAGAGTCGAGGAGTCAGTGGTGGAGTCGTACTC GGTGTACCATCGGACAGCTCAGCGGGCATCTGCC

cap\_C4-2 T7 863 ba+TAACGTACTCGCCACCGGTAGAGGGGATGCTCAGAGTCGAGGAGTCAGTGGTGGAGTCGTACTC GGTGTACCATCGGACAGCTCAGCGGGCATCTGCC

cap\_C4-2 TanC1 863+

cap\_C2-2 TanC2 863-TAACGTACTCGCCACCGGTAGAGGGGATGCTCAGAGTCGAGGAGTCAGTGGTGGAGTCGTACTC GGTGTACCATCGGACAGCTCAGCGGGCATCTGCC

cap\_C1-2 TanC2 863-TAACGTACTCGCCACCGGTAGAGGGGATGCTCAGAGTCGAGGAGTCAGTGGTGGAGTCGTACTC GGTGTACCATCGGACAGCTCAGCGGGCATCTGCC

cap\_C4-2 TanC2 863-TAACGTACTCGCCACCGGTAGAGGGGATGCTCAGAGTCGAGGAGTCAGTGGTGGAGTCGTACTC GGTGTACCATCGGACAGCTCAGCGGGCATCTGCC

cap\_C3-2 TanC2 863-TAACGTACTCGCCACCGGTAGAGGGGATGCTCAGAGTCGAGGAGTCAGTGGTGGAGTCGTACTC GGTGTACCATCGGACAGCTCAGCGGGCATCTGCC

cap\_C3-2 TanC1 863+

cap\_C1-2 TanC1 863+

cap\_C2-2 TanC1 863+

cap\_C2-2 SP6 863 b-

cap\_C3-2 SP6 863 b-

cap\_C5-1 SP6 863 b-

cap\_C4-2 SP6 863 b-

cap\_C1-2 SP6 863 -

Contig-0 TAACGTACTCGCCACCGGTAGAGGGGATGCTCAGAGTCGAGGAGTCAGTGGTGGAGTCGTACTC GGTGTACCATCGGACAGCTCAGCGGGCATCTGCC

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800

cap\_C2-2 T7 863 ba+ACGAGAGGTAAACACCGCTTGCCGTTAGAGTCGCTGAAGACCGCTGTAATGGCTTNNCCGAGAGCA CACCCCTCAGCGGTGACGCTGCCGT TCTGGG

cap\_C3-2 T7 863 ba+ACGAGAGGTAAACACCGCTTGCCGTTAGAGTCGCTGAAGACCGCTGTAATGGCTTNNCCGAGAGCA CACCCCTCAGCGGTGACGCTGCCGT TCTGGG

cap\_C5-1 T7 863 ba+ACGAGAGGTAAACACCGCTTGCCGTTAGAGTCGCTGAAGACCGCTGTAATGGCTTNNCCGAGAGCA CACCCCTCAGCGGTGACGCTGCCGT TCTGGG

cap\_C1-2 T7 863 ba+ACGAGAGGTAAACACCGCTTGCCGTTAGAGTCGCTGAAGACCGCTGTAATGGCTTNNCCGAGAGCA CACCCCTCAGCGGTGACGCTGCCGT TCTGGG

cap\_C4-2 T7 863 ba+ACGAGAGGTAAACACCGCTTGCCGTTAGAGTCGCTGAAGACCGCTGTAATGGCTTNNCCGAGAGCA CACCCCTCAGCGGTGACGCTGCCGT TCTGGG

cap\_C4-2 TanC1 863+

cap\_C2-2 TanC2 863-ACGAGAGGTAAACACCGCTTGCCGTTAGAGTCGCTGAAGACCGCTGTAATGGCTTNNCCGAGAGCA CACCCCTCAGCGGTGACGCTGCCGT TCTGGG

cap\_C1-2 TanC2 863-ACGAGAGGTAAACACCGCTTGCCGTTAGAGTCGCTGAAGACCGCTGTAATGGCTTNNCCGAGAGCA CACCCCTCAGCGGTGACGCTGCCGT TCTGGG

cap\_C4-2 TanC2 863-ACGAGAGGTAAACACCGCTTGCCGTTAGAGTCGCTGAAGACCGCTGTAATGGCTTNNCCGAGAGCA CACCCCTCAGCGGTGACGCTGCCGT TCTGGG

cap\_C3-2 TanC2 863-ACGAGAGGTAAACACCGCTTGCCGTTAGAGTCGCTGAAGACCGCTGTAATGGCTTNNCCGAGAGCA CACCCCTCAGCGGTGACGCTGCCGT TCTGGG

cap\_C3-2 TanC1 863+

cap\_C1-2 TanC1 863+

cap\_C2-2 TanC1 863+

cap\_C2-2 SP6 863 b-

cap\_C3-2 SP6 863 b-

cap\_C5-1 SP6 863 b-

cap\_C4-2 SP6 863 b-

cap\_C1-2 SP6 863 -

Contig-0 ACGAGAGGTAAACACCGCTTGCCGTTAGAGTCGCTGAAGACCGCTGTAATGGCTTNNCCGAGAGCA CACCCCTCAGCGGTGACGCTGCCGT TCTGGG

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900

cap\_C2-2 T7 863 ba+

cap\_C3-2 T7 863 ba+

cap\_C5-1 T7 863 ba+

cap\_C1-2 T7 863 ba+

cap\_C4-2 T7 863 ba+NNTGGTAGCTAGTANNCTGN

cap\_C4-2 TanC1 863+CTGGTAGCTAGTAGTGCTG CTTTCAGCACGCTTGCTGAAGCCAAAGCCAGGGAGGTGTAGTTCTGTTTCAGGCGAGTAGTAGGACTCGCCAAATGATGG

cap\_C2-2 TanC2 863-CTGGTAGCTAGTAGTGCTG CTTTCAGCACGCTTGCTGAAGCCAAAGCCAGGGAGGTGTAGTTCTGTTTCAGGCGAGTAGTAGGACTCGCCAAATGATGG

cap\_C1-2 TanC2 863-CTGGTAGCTAGTAGTGCTG CTTTCAGCACGCTTGCTGAAGCCAAAGCCAGGGAGGTGTAGTTCTGTTTCAGGCGAGTAGTAGGACTCGCCAAATGATGG

cap\_C4-2 TanC2 863-CTGGTAGCTAGTAGTGCTG CTTTCAGCACGCTTGCTGAAGCCAAAGCCAGGGAGGTGTAGTTCTGTTTCAGGCGAGTAGTAGGACTCGCCAAATGATGG

cap\_C3-2 TanC2 863-CTGGTAGCTAGTAGTGCTG CTTTCAGCACGCTTGCTGAAGCCAAAGCCAGGGAGGTGTAGTTCTGTTTCAGGCGAGTAGTAGGACTCGCCAAATGATGG

cap\_C3-2 TanC1 863+CTGGTAGCTAGTAGTGCTG CTTTCAGCACGCTTGCTGAAGCCAAAGCCAGGGAGGTGTAGTTCTGTTTCAGGCGAGTAGTAGGACTCGCCAAATGATGG

cap\_C1-2 TanC1 863+CTGGTAGCTAGTAGTGCTG CTTTCAGCACGCTTGCTGAAGCCAAAGCCAGGGAGGTGTAGTTCTGTTTCAGGCGAGTAGTAGGACTCGCCAAATGATGG

cap\_C2-2 TanC1 863+CTGGTAGCTAGTAGTGCTG CTTTCAGCACGCTTGCTGAAGCCAAAGCCAGGGAGGTGTAGTTCTGTTTCAGGCGAGTAGTAGGACTCGCCAAATGATGG

cap\_C2-2 SP6 863 b-

cap\_C3-2 SP6 863 b-

cap\_C5-1 SP6 863 b-

cap\_C4-2 SP6 863 b-

cap\_C1-2 SP6 863 -

Contig-0 CTGGTAGCTAGTAGTGCTG CTTTCAGCACGCTTGCTGAAGCCAAAGCCAGGGAGGTGTAGTTCTGTTTCAGGCGAGTAGTAGGACTCGCCAAATGATGG

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000

cap\_C2-2 T7 863 ba+

cap\_C3-2 T7 863 ba+

cap\_C5-1 T7 863 ba+

cap\_C1-2 T7 863 ba+

cap\_C4-2 T7 863 ba+

cap\_C4-2 TanC1 863+AGGTGAGGTTGAAGTTACGATGCAAAAGGTCAGTACGGGAGACAA CG C CATCGG TACGGCCGTCGAGAGGGTCACAGGCTTCGATGGTAGCGT

cap\_C2-2 TanC2 863-AGGTGAGGTTGAAGTTACGATGCAAAAGGTCAGTACGGGAGACAA CG C CATCGG TACGGCCGTCGAGAGGGTCACAGGCTTCGATGGTAGCGT

cap\_C1-2 TanC2 863-AGGTGAGGTTGAAGTTACGATGCAAAAGGTCAGTACGGGAGACAA CG C CATCGG TACGGCCGTCGAGAGGGTCACAGGCTTCGATGGTAGCGT

cap\_C4-2 TanC2 863-AGGTGAGGTTGAAGTTACGATGCAAAAGGTCAGTACGGGAGACAA CG C CATCGG TACGGCCGTCGAGAGGGTCACAGGCTTCGATGGTAGCGT

cap\_C3-2 TanC2 863-AGGTGAGGTTGAAGTTACGATGCAAAAGGTCAGTACGGGAGACAA CG C CATCGG TACGGCCGTCGAGAGGGTCACAGGCTTCGATGGTAGCGT

cap\_C3-2 TanC1 863+AGGTGAGGTTGAAGTTACGATGCAAAAGGTCAGTACGGGAGACAA CG C CATCGG TACGGCCGTCGAGAGGGTCACAGGCTTCGATGGTAGCGT

cap\_C1-2 TanC1 863+AGGTGAGGTTGAAGTTACGATGCAAAAGGTCAGTACGGGAGACAA CG C CATCGG TACGGCCGTCGAGAGGGTCACAGGCTTCGATGGTAGCGT

cap\_C2-2 TanC1 863+AGGTGAGGTTGAAGTTACGATGCAAAAGGTCAGTACGGGAGACAA CG C CATCGG TACGGCCGTCGAGAGGGTCACAGGCTTCGATGGTAGCGT

cap\_C2-2 SP6 863 b- NGC C CATCGN TACGGCCGTCGAGAGGGTCACAGGCTTCGATGGTAGCGT

cap\_C3-2 SP6 863 b- CG C CATCGG TACGGCCGTCGAGAGGGTCACAGGCTTCGATGGTAGCGT

cap\_C5-1 SP6 863 b- GAACNNNC CNNTNACCGG TNGAGAGG TCACAGGNTN A GGTTN GT

cap\_C4-2 SP6 863 b- CATNG TACGGCCGTCGAGAGG TCACAGGCTTCGATGGTAGCGT

cap\_C1-2 SP6 863 - GGCCNTCGAGAGG TCACAGGCTTCGATGGTAGCGT

Contig-0

AGGTGAGGTTGAAGTTCAGCATGCAAAAGGTCAGTACGGGAGACAA-CG-C-CATCGG-TACGGCCGTCGAGAGGGTCACAGGCTTCATGGTAGCGT

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100

cap\_C2-2 T7 863 ba+

cap\_C3-2 T7 863 ba+

cap\_C5-1 T7 863 ba+

cap\_C1-2 T7 863 ba+

cap\_C4-2 T7 863 ba+

cap\_C4-2 TanC1 863+TGACG-AT

cap\_C2-2 TanC2 863-TGACG-ATCTTGTCAAGTTCGCAA-GGGGAGGGTAG

cap\_C1-2 TanC2 863-TGACG-ATCTTGTCAAGTTCGCAA-GGGGAGGGTAG

cap\_C4-2 TanC2 863-TGACGTATCTTGTCAAGTTCGCAA-GGGGAGGGTAG

cap\_C3-2 TanC2 863-TGACG-ATCTTGTCAAGTTCGCAA-GGGGAGGGTAG

cap\_C1-2 TanC1 863+TGACG-ATCTTGTCAAGTTCGCAA-GGGGAGGGTAGTATCCATGGTGTGTTCAATAGTGGCAGGGAAGACGTGGTGGACCTGCTGCTGAGCAAAGCGG

cap\_C2-2 TanC1 863+TGACG-ATCTTGTCAAGTTCGCAA-GGGGAGGGTAGTATCCATGGTGTGTTCAATAGTGGCAGGGAAGACGTGGTGGACCTGCTGCTGAGCAAAGCGG

cap\_C2-2 SP6 863 b-NGACG-ATCTTGTCAAGTTCGCAAAGGGGAGGGTAGTATCCATGGTGTGTTCAATAGTGGCAGGGAAGACGTGGTGGACCTGCTGCTGAGCAAAGCGG

cap\_C3-2 SP6 863 b-TGACG-ATCTTGTCAAGTTCGCAA-GGGG-AGGGTAGTATCCATGGTGTGTTCAATAGTGGCAGGGAAGACGTGGTGGACCTGCTGCTGAGCAAAGCGG

cap\_C5-1 SP6 863 b-TGA-G-ATCTN-TCAAGTNN-CAA-GGGG-AGGGTAGTATCCATG-TGTGT-CA-TNNTGGCAGGGAAGACGTGGTGAACN-MNN-NGACGAAAGNG

cap\_C4-2 SP6 863 b-TGACG-ATNNTNTCAAGTTNGCAA-GGGGAGGGTAGTANNCCATGGTGTGTTCAATAGTGGCAGGGAAGACGTGGTGGACCTGCTGCTGAGCAAAGCGG

cap\_C1-2 SP6 863 -TGACG-ATNNTNTCAAGTTCGCAA-GGGGAGGGTAGTANNCCATGGTGTGTTCAATAGTGGCAGGGAAGACGTGGTGGACCTGCTGCTGAGCAAAGCGG

Contig-0 863-TGACG-ATCTTGTCAAGTTCGCAA-GGGGAGGGTAGTAGTATCCATGGTGTGTTCAATAGTGGCAGGGAAGACGTGGTGGACCTGCTGCTGAGCAAAGCGG

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200

cap\_C2-2 T7 863 ba+

cap\_C3-2 T7 863 ba+

cap\_C5-1 T7 863 ba+

cap\_C1-2 T7 863 ba+

cap\_C4-2 T7 863 ba+

cap\_C4-2 TanC1 863+

cap\_C2-2 TanC2 863-

cap\_C1-2 TanC2 863-

cap\_C4-2 TanC2 863-

cap\_C3-2 TanC2 863-

cap\_C3-2 TanC1 863+AAGGCAGGGGCACCGCAATGACACCGTCATATTCATCTCCCCAGCGCTGGACCTGACTCATACCTCAGCAGCCACCATCGGAACAGCCCTCGTAGTAGG

cap\_C1-2 TanC1 863+AAGGCAGGGGCACCGCAATGACACCGTCATATTCATCTCCCCAGCGCTGGACCTGACTCATACCTCAGCAGCCACCATCGGAACAGCCCTCGTAGTAGG

cap\_C2-2 TanC1 863+AAGGCAGGGGCACCGCAATGACACCGTCATATTCATCTCCCCAGCGCTGGACCTGACTCATACCTCAGCAGCCACCATCGGAACAGCCCTCGTAGTAGG

cap\_C2-2 SP6 863 b-AAGGCAGGGGCACCGCAATGACACCGTCATATTCATCTCCCCAGCGCTGGACCTGACTCATACCTCAGCAGCCACCATCGGAACAGCCCTCGTAGTAGG

cap\_C3-2 SP6 863 b-AAGGCAGGGGCACCGCAATGACACCGTCATATTCATCTCCCCAGCGCTGGACCTGACTCATACCTCAGCAGCCACCATCGGAACAGCCCTCGTAGTAGG

cap\_C5-1 SP6 863 b-AAGGCAGGGGCACCGCAATGACACCGTCATATTCATCTCCCCAGCGCTGGACCTGACTCATACCTCAGCAGCCACCATCGGAACAGCCCTCGTAGTAGG

cap\_C4-2 SP6 863 b-AAGGCAGGGGCACCGCAATGACACCGTCATATTCATCTCCCCAGCGCTGGACCTGACTCATACCTCAGCAGCCACCATCGGAACAGCCCTCGTAGTAGG

cap\_C1-2 SP6 863 -AAGGCAGGGGCACCGCAATGACACCGTCATATTCATCTCCCCAGCGCTGGACCTGACTCATACCTCAGCAGCCACCATCGGAACAGCCCTCGTAGTAGG

Contig-0 AAGGCAGGGGCACCGCAATGACACCGTCATATTCATCTCCCCAGCGCTGGACCTGACTCATACCTCAGCAGCCACCATCGGAACAGCCCTCGTAGTAGG

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300

cap\_C2-2 T7 863 ba+

cap\_C3-2 T7 863 ba+

cap\_C5-1 T7 863 ba+

cap\_C1-2 T7 863 ba+

cap\_C4-2 T7 863 ba+

cap\_C4-2 TanC1 863+

cap\_C2-2 TanC2 863-

cap\_C1-2 TanC2 863-

cap\_C4-2 TanC2 863-

cap\_C3-2 TanC2 863-

cap\_C3-2 TanC1 863+TGATAGTCTTCTTGTGCTGGAGAGACCGTAGAAACACGGGTCAGGGGCTTGGCGATCTTGGTCATTTACCAAGAGCCTGGTAGGAGAACATGTAAGT

cap\_C1-2 TanC1 863+TGATAGTCTTCTTGTGCTGGAGAGACCGTAGAAACACGGGTCAGGGGCTTGGCGATCTTGGTCATTTACCAAGAGCCTGGTAGGAGAACATGTAAGT

cap\_C2-2 TanC1 863+TGATAGTCTTCTTGTGCTGGAGAGACCGTAGAAACACGGGTCAGGGGCTTGGCGATCTTGGTCATTTACCAAGAGCCTGGTAGGAGAACATGTAAGT

cap\_C2-2 SP6 863 b-TGATAGTCTTCTTGTGCTGGAGAGACCGTAGAAACACGGGTCAGGGGCTTGGCGATCTTGGTCATTTACCAAGAGCCTGGTAGGAGAACATGTAAGT

cap\_C3-2 SP6 863 b-TGATAGTCTTCTTGTGCTGGAGAGACCGTAGAAACACGGGTCAGGGGCTTGGCGATCTTGGTCATTTACCAAGAGCCTGGTAGGAGAACATGTAAGT

cap\_C5-1 SP6 863 b-TGATAGTCTTCTTGTGCTGGAGAGACCGTAGAAACACGGGTCAGGGGCTTGGCGATCTTGGTCATTTACCAAGAGCCTGGTAGGAGAACATGTAAGT

cap\_C4-2 SP6 863 b-TGATAGTCTTCTTGTGCTGGAGAGACCGTAGAAACACGGGTCAGGGGCTTGGCGATCTTGGTCATTTACCAAGAGCCTGGTAGGAGAACATGTAAGT

cap\_C1-2 SP6 863 -TGATAGTCTTCTTGTGCTGGAGAGACCGTAGAAACACGGGTCAGGGGCTTGGCGATCTTGGTCATTTACCAAGAGCCTGGTAGGAGAACATGTAAGT

Contig-0 TGATAGTCTTCTTGTGCTGGAGAGACCGTAGAAACACGGGTCAGGGGCTTGGCGATCTTGGTCATTTACCAAGAGCCTGGTAGGAGAACATGTAAGT

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400

cap\_C2-2 T7 863 ba+

cap\_C3-2 T7 863 ba+

cap\_C5-1 T7 863 ba+

cap\_C1-2 T7 863 ba+

cap\_C4-2 T7 863 ba+

cap\_C4-2 TanC1 863+

cap\_C2-2 TanC2 863-

cap\_C1-2 TanC2 863-

cap\_C4-2 TanC2 863-

cap\_C3-2 TanC2 863-

cap\_C3-2 TanC1 863+AGCATCCAGTTGATCGAGCCGTTGCGTAGAGGACGACTTCATCATAGCTGTAGGAGAAGGCGTCGTAGCCGGCTCGGTGGCGCCGAGGCGAGCACCG

cap\_C1-2 TanC1 863+AGCATCCAGTTGATCGAGCCGTTGCGTAGAGGACGACTTCATCATAGCTGTAGGAGAAGGCGTCGTAGCCGGCTCGGTGGCGCCGAGGCGAGCACCG

cap\_C2-2 TanC1 863+AGCATCCAGTTGATCGAGCCGTTGCGTAGAGGACGACTTCATCATAGCTGTAGGAGAAGGCGTCGTAGCCGGCTCGGTGGCGCCGAGGCGAGCACCG

cap\_C2-2 SP6 863 b-AGCATCCAGTTGATCGAGCCGTTGCGTAGAGGACGACTTCATCATAGCTGTAGGAGAAGGCGTCGTAGCCGGCTCGGTGGCGCCGAGGCGAGCACCG

cap\_C3-2 SP6 863 b-AGCATCCAGTTGATCGAGCCGTTGCGTAGAGGACGACTTCATCATAGCTGTAGGAGAAGGCGTCGTAGCCGGCTCGGTGGCGCCGAGGCGAGCACCG

cap\_C5-1 SP6 863 b-AGCATCCAGTTGATCGAGCCGTTGCGTAGAGGACGACTTCATCATAGCTGTAGGAGAAGGCGTCGTAGCCGGCTCGGTGGCGCCGAGGCGAGCACCG

cap\_C4-2 SP6 863 b-AGCATCCAGTTGATCGAGCCGTTGCGTAGAGGACGACTTCATCATAGCTGTAGGAGAAGGCGTCGTAGCCGGCTCGGTGGCGCCGAGGCGAGCACCG

cap\_C1-2 SP6 863 -AGCATCCAGTTGATCGAGCCGTTGCGTAGAGGACGACTTCATCATAGCTGTAGGAGAAGGCGTCGTAGCCGGCTCGGTGGCGCCGAGGCGAGCACCG

Contig-0 AGCATCCAGTTGATCGAGCCGTTGCGTAGAGGACGACTTCATCATAGCTGTAGGAGAAGGCGTCGTAGCCGGCTCGGTGGCGCCGAGGCGAGCACCG

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500

cap\_C2-2 T7 863 ba+

cap\_C3-2 T7 863 ba+

cap\_C5-1 T7 863 ba+

cap\_C1-2 T7 863 ba+

cap\_C4-2 T7 863 ba+

cap\_C4-2 TanC1 863+

cap\_C2-2 TanC2 863-

cap\_C1-2 TanC2 863-

cap\_C4-2 TanC2 863-

cap\_C3-2 TanC2 863-

cap\_C3-2 TanC1 863+TACTCGAGACCCAGTAGCATCGCTGGACAGGGAGAAACCCACCGGCAACGTAGAAACGGTTCTTGAAGTNNG-AAANN-GCGGGCNGG-CGTAC

cap\_C2-2 TanC1 863+TACTCGAGACCCAGTAGCATCGCTGGACAGGGAGAAACCCACCGGCAACGTAGAAACGGTTCTTGAAGTNN-GNAANN-GCGGGCNGG-CGTAC

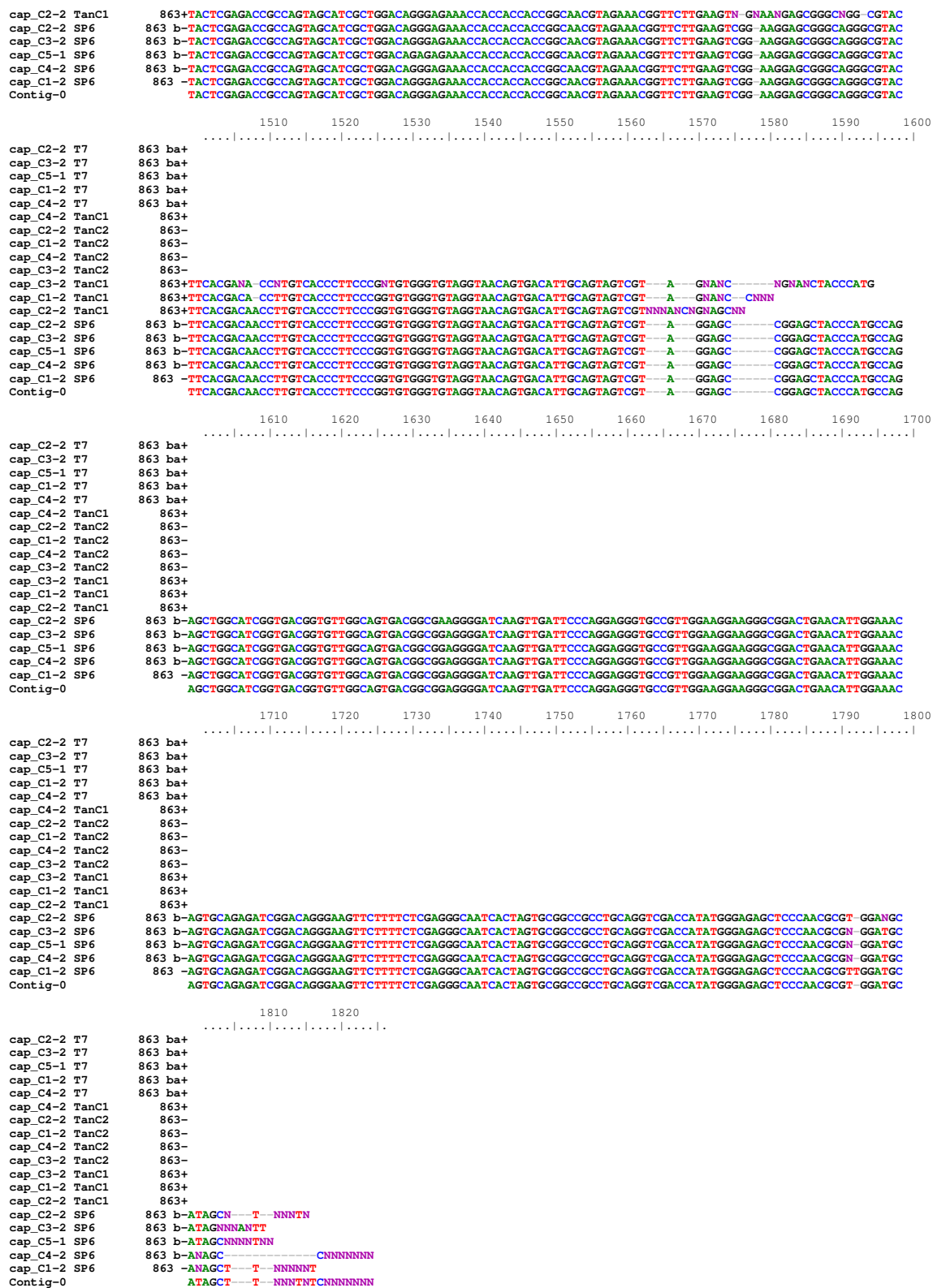


Figura 23. Alineamiento realizado con el modulo CAP de *Bioedit* entre las secuencias obtenidas por secuenciación de cinco plásmidos pGEMANTGHI con los iniciadores T7 y SP6, y cuatro plásmidos pGEMANTGHI con los iniciadores 5'TanC1 y 3'TanC2.

En la Figura 24 se muestra la traducción realizada con el programa *Bioedit* del primer marco de lectura de la secuencia nucleotídica de la tanasa de *A. niger* GH1, la cual se consideró como la secuencia aminoácídica de la tanasa de *A. niger* GH1.

1	ACT	TCC	CTG	TCC	GAT	CTC	TGC	ACT	GTT	TCC	AAT	GTT	CAG	TCC	GCC	45
1	Thr	Ser	Leu	Ser	Asp	Leu	Cys	Thr	Val	Ser	Asn	Val	Gln	Ser	Ala	15
46	CTT	CCT	TCC	AAC	GGC	ACC	CTC	CTG	GGA	ATC	AAC	TTG	ATC	CCC	TCC	90
16	Leu	Pro	Ser	Asn	Gly	Thr	Leu	Leu	Gly	Ile	Asn	Leu	Ile	Pro	Ser	30
91	GCC	GTC	ACT	GCC	AAC	ACC	GTC	ACC	GAT	GCC	AGC	TCT	GGC	ATG	GGT	135
31	Ala	Val	Thr	Ala	Asn	Thr	Val	Thr	Asp	Ala	Ser	Ser	Gly	Met	Gly	45
136	AGC	TCC	GGC	TCC	TAC	GAC	TAC	TGC	AAT	GTC	ACT	GTT	ACC	TAC	ACC	180
46	Ser	Ser	Gly	Ser	Tyr	Asp	Tyr	Cys	Asn	Val	Thr	Val	Thr	Tyr	Thr	60
181	CAC	ACC	GGG	AAG	GGT	GAC	AAG	GTT	GTC	GTG	AAG	TAC	GCC	CTG	CCC	225
61	His	Thr	Gly	Lys	Gly	Asp	Lys	Val	Val	Val	Lys	Tyr	Ala	Leu	Pro	75
226	GCT	CCT	TCC	GAC	TTC	AAG	AAC	CGT	TTC	TAC	GTT	GCC	GGT	GGT	GGT	270
76	Ala	Pro	Ser	Asp	Phe	Lys	Asn	Arg	Phe	Tyr	Val	Ala	Gly	Gly	Gly	90
271	GGT	TTC	TCC	CTG	TCC	AGC	GAT	GCT	ACT	GGC	GGT	CTC	GAG	TAC	GGT	315
91	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Ser	Asp	Ala	Thr	Gly	Gly	Leu	Glu	Tyr	Gly	105
316	GCT	GCC	TCC	GGC	GCC	ACC	GAC	GCC	GGC	TAC	GAC	GCC	TTC	TCC	TAC	360
106	Ala	Ala	Ser	Gly	Ala	Thr	Asp	Ala	Gly	Tyr	Asp	Ala	Phe	Ser	Tyr	120
361	AGC	TAT	GAT	GAA	GTC	GTC	CTC	TAC	GGC	AAC	GGC	TCG	ATC	AAC	TGG	405
121	Ser	Tyr	Asp	Glu	Val	Val	Leu	Tyr	Gly	Asn	Gly	Ser	Ile	Asn	Trp	135
406	GAT	GCT	ACT	TAC	ATG	TTC	TCC	TAC	CAG	GCT	CTT	GGT	GAA	ATG	ACC	450
136	Asp	Ala	Thr	Tyr	Met	Phe	Ser	Tyr	Gln	Ala	Leu	Gly	Glu	Met	Thr	150
451	AAG	ATC	GCC	AAG	CCC	CTG	ACC	CGT	GGT	TTC	TAC	GGT	CTC	TCC	AGC	495
151	Lys	Ile	Ala	Lys	Pro	Leu	Thr	Arg	Gly	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Ser	165
496	GAC	AAG	AAG	ATC	TAC	ACC	TAC	TAC	GAG	GGC	TGT	TCC	GAT	GGT	GGT	540
166	Asp	Lys	Lys	Ile	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Glu	Gly	Cys	Ser	Asp	Gly	Gly	180
541	CGT	GAG	GGT	ATG	AGT	CAG	GTC	CAG	CGC	TGG	GGA	GAT	GAA	TAT	GAC	585
181	Arg	Glu	Gly	Met	Ser	Gln	Val	Gln	Arg	Trp	Gly	Asp	Glu	Tyr	Asp	195
586	GGT	GTC	ATT	GCC	GGT	GCC	CCT	GCC	TTC	CGC	TTT	GCT	CAG	CAG	CAG	630
196	Gly	Val	Ile	Ala	Gly	Ala	Pro	Ala	Phe	Arg	Phe	Ala	Gln	Gln	Gln	210
631	GTC	CAC	CAC	GTC	TTC	CCT	GCC	ACT	ATT	GAA	CAC	ACC	ATG	GAC	TAC	675
211	Val	His	His	Val	Phe	Pro	Ala	Thr	Ile	Glu	His	Thr	Met	Asp	Tyr	225
676	TAC	CCT	CCC	CCT	TGC	GAA	CTT	GAC	AAG	ATC	GTC	AAC	GCT	ACC	ATC	720
226	Tyr	Pro	Pro	Pro	Cys	Glu	Leu	Asp	Lys	Ile	Val	Asn	Ala	Thr	Ile	240
721	GAA	GCC	TGT	GAC	CCT	CTC	GAC	GGC	CGT	ACC	GAT	GGC	GTT	GTC	TCC	765
241	Glu	Ala	Cys	Asp	Pro	Leu	Asp	Gly	Arg	Thr	Asp	Gly	Val	Val	Ser	255
766	CGT	ACT	GAC	CTT	TGC	ATG	CTG	AAC	TTC	AAC	CTC	ACC	TCC	ATC	ATT	810
256	Arg	Thr	Asp	Leu	Cys	Met	Leu	Asn	Phe	Asn	Leu	Thr	Ser	Ile	Ile	270
811	GGC	GAG	TCC	TAC	TAC	TGC	GCT	GAA	CAG	AAC	TAC	ACC	TCC	CTG	GGC	855
271	Gly	Glu	Ser	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Glu	Gln	Asn	Tyr	Thr	Ser	Leu	Gly	285

856	TTT	GGC	TTC	AGC	AAG	CGT	GCT	GAA	GGC	AGC	ACT	ACT	AGC	TAC	CAG	900
286	Phe	Gly	Phe	Ser	Lys	Arg	Ala	Glu	Gly	Ser	Thr	Thr	Ser	Tyr	Gln	300
901	CCC	GCC	CAG	AAC	GGC	AGC	GTC	ACC	GCT	GAG	GGT	GTT	GCT	CTC	GCC	945
301	Pro	Ala	Gln	Asn	Gly	Ser	Val	Thr	Ala	Glu	Gly	Val	Ala	Leu	Ala	315
946	CAG	GCC	ATC	TAC	GAC	GGT	CTT	CAC	GAC	TCT	AAC	GGC	AAG	CGT	GCT	990
316	Gln	Ala	Ile	Tyr	Asp	Gly	Leu	His	Asp	Ser	Asn	Gly	Lys	Arg	Ala	330
991	TAC	CTC	TCG	TGG	CAG	ATC	GCC	GCT	GAG	CTG	TCC	GAT	GGT	GAC	ACC	1035
331	Tyr	Leu	Ser	Trp	Gln	Ile	Ala	Ala	Glu	Leu	Ser	Asp	Gly	Asp	Thr	345
1036	GAG	TAC	GAC	TCC	ACC	ACT	GAC	TCC	TGG	ACT	CTG	AGC	ATC	CCC	TCT	1080
346	Glu	Tyr	Asp	Ser	Thr	Thr	Asp	Ser	Trp	Thr	Leu	Ser	Ile	Pro	Ser	360
1081	ACC	GGT	GGC	GAG	TAC	GTT	ACC	AAG	TTC	GTG	CAG	CTC	CTC	AAC	ATC	1125
361	Thr	Gly	Gly	Glu	Tyr	Val	Thr	Lys	Phe	Val	Gln	Leu	Leu	Asn	Ile	375
1126	GAT	AAC	CTG	GAG	AAC	CTC	GAC	AAC	GTC	ACC	TAC	GAC	ACC	CTG	GTC	1170
376	Asp	Asn	Leu	Glu	Asn	Leu	Asp	Asn	Val	Thr	Tyr	Asp	Thr	Leu	Val	390
1171	GAC	TGG	ATG	AAC	ATC	GGT	ATG	ATT	CGC	TAC	ATT	GAC	AGT	CTC	CAG	1215
391	Asp	Trp	Met	Asn	Ile	Gly	Met	Ile	Arg	Tyr	Ile	Asp	Ser	Leu	Gln	405
1216	ACC	ACC	GTC	ATC	GAC	CTC	ACC	ACC	TTC	AAG	GAG	TCC	GGT	GGT	AAG	1260
406	Thr	Thr	Val	Ile	Asp	Leu	Thr	Thr	Phe	Lys	Glu	Ser	Gly	Gly	Lys	420
1261	ATG	ATC	CAC	TAC	CAT	GGT	GAA	TCC	GAC	CCC	AGT	ATC	CCC	ACC	GCC	1305
421	Met	Ile	His	Tyr	His	Gly	Glu	Ser	Asp	Pro	Ser	Ile	Pro	Thr	Ala	435
1306	TCG	TCC	GTC	CAC	TAC	TGG	CAG	TCT	GTC	CGT	CAG	GCC	ATG	TAC	CCC	1350
436	Ser	Ser	Val	His	Tyr	Trp	Gln	Ser	Val	Arg	Gln	Ala	Met	Tyr	Pro	450
1351	AAC	ACC	ACC	TAC	ACC	CAG	TCC	CTG	CAG	GAT	ATG	TCC	AAC	TGG	TAC	1395
451	Asn	Thr	Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Leu	Gln	Asp	Met	Ser	Asn	Trp	Tyr	465
1396	CAG	CTC	TAC	CTC	GTC	CCC	GGC	GCT	GCT	CAC	TGC	GGT	ACC	AAC	TCC	1440
466	Gln	Leu	Tyr	Leu	Val	Pro	Gly	Ala	Ala	His	Cys	Gly	Thr	Asn	Ser	480
1441	CTC	CAG	CCT	GGT	CCT	TAC	CCC	GAG	GAC	AAC	ATG	GAG	ATC	ATG	ATC	1485
481	Leu	Gln	Pro	Gly	Pro	Tyr	Pro	Glu	Asp	Asn	Met	Glu	Ile	Met	Ile	495
1486	GAC	TGG	GTT	GAG	AAC	GGC	AAC	AAG	CCT	TCC	CGC	CTC	AAC	GCC	ACC	1530
496	Asp	Trp	Val	Glu	Asn	Gly	Asn	Lys	Pro	Ser	Arg	Leu	Asn	Ala	Thr	510
1531	GTC	TCC	TCC	GGC	ACC	TAT	GCT	GGT	GAG	ACC	CAG	ATG	CTT	TGC	CAG	1575
511	Val	Ser	Ser	Gly	Thr	Tyr	Ala	Gly	Glu	Thr	Gln	Met	Leu	Cys	Gln	525
1576	TGG	CCT	TCT	CGT	CCC	CTC	TGG	AAC	AGC	AAC	TCC	AGC	TTC	TCT	TGT	1620
526	Trp	Pro	Ser	Arg	Pro	Leu	Trp	Asn	Ser	Asn	Ser	Ser	Phe	Ser	Cys	540
1621	GTT	CAC	GAC	TCC	AAG	TCC	CTT	GCT	ACT	TGG	GAC	TAC	ACT	TTT	GAT	1665
541	Val	His	Asp	Ser	Lys	Ser	Leu	Ala	Thr	Trp	Asp	Tyr	Thr	Phe	Asp	555
1666	GCT	TTC	AAG	ATG	CCC	GTT	TTT	TAA								1689
556	Ala	Phe	Lys	Met	Pro	Val	Phe	End								563

**Figura24. Traducción del fragmento ANTGH1.**

En las Figuras 25 y 26 se muestra el alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídica y aminoacídica, respectivamente, de la tanasa de *A. niger* GH1 con las seis

secuencias de tanasas fúngicas que presentaron mayor identidad con la tanasa de *A. niger* GH1.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
A. kawachi IFO4308AGTTCCTCGTCCGATCTCTGCACGTGTTTCCAATGTTTCAGTCCGCCCTTCCTTCTAACGGCACCCCTCCTGGGAATCAACTGATCCCCCTCCGCCGTCACTG
A. niger CBS513.88ATTCCTCGTCCGATCTCTGCACGTGTTTCCAATGTTTCAGTCCGCCCTTCCTTCTAACGGCACCCCTCCTGGGCATCGACTGATCCCCCTCTGCAGTCACTG
A. niger ATCC1015 ACTTCCCTGTCGATCTCTGCACGTGTTTCCAATGTTTCAGTCCGCCCTTCCTTCTAACGGCACCCCTCCTGGGCATCAACTGATCCCCCTCTGCAGTCACTG
A. niger      TCTCTCTCCGATGTCTGCACGTGTTTCCAAGTTCAGTCTGCCCTTCCTTCCAATGGCACTTCTCTGGCATTGACTGATCCCCCTCCGCTGTCACTG
A. ruber CBS135680 TCTCTCTCCGATGTCTGCACGTGTTTCCAATGTTTCAGTCCGCCCTTCCTTCCAATGGCACTTCTCTGGCATTGACTGATCCCCCTCCGCTGTCACTG
A. terreus NIH2624ACGTGCTCTGGACCTGTGCACGTGTTTCCAATGTTTCAGTCCGCCCTTCCTTCTAACGGCACCCCTTACTCGGAATCAACTGATCCCCCTCTGCAGTCACTG
A. niger GH1     ACTTCCCTGTCGATCTCTGCACGTGTTTCCAATGTTTCAGTCCGCCCTTCCTTCTAACGGCACCCCTCCTGGGAATCAACTGATCCCCCTCCGCCGTCACTG

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
A. kawachi IFO4308CCAAACCGGTACCCGATGCCAGCTC-----TGGCATGGGTAGCTCC-----GGCTCCTACGACTACTGCAATGTCACTGTTAGCTACAC
A. niger CBS513.88CCAAACCGGTACCCGATGCCAGCTC-----TGGCATGGGTAGCTCC-----GGCTCCTACGACTACTGCAACGTCACTGTCACTACAC
A. niger ATCC1015 CCAATACGTACCCGATGCCAGTTC-----TGGCATGGGTAGCTCC-----GGCTCCTACGACTACTGCAACGTCACTGTCACTACAC
A. niger      CCAATACGTACCCGATGCCAGCTCC-----CGGCATGGGTAGCTCC-----ACCACTACGACTACTGCAACGTCACTGTCACTACAC
A. ruber CBS135680CCAGCGCCGCTACCAACGCTTCTGC-----TGGTATGGGTAGCTCC-----ACCTACCTATTGTAACGTCACTGTCACTACAC
A. terreus NIH2624CCAGTCTGTCTCAACGCAACCGTGGCGGTGGCATGGGTTCCTACCTCGAGCTCCGCGAGCTACCTACGACTACTGCAACGTCACTGTCACTACAC
A. niger GH1     CCAACACCGTACCCGATGCCAGTTC-----TGGCATGGGTAGCTCC-----GGCTCCTACGACTACTGCAATGTCACTGTTAGCTACAC

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
A. kawachi IFO4308TACACCGGGGAAGGGTGACAAGGTTGTCGTGAAGTACGCCCTGCCCGCTCCTTCCGACTTCAAGAACCGTTTCTACGTTGCCGGTGGTGGTGGTTTCCTCC
A. niger CBS513.88TACACCGGGGAAGGGTGACAAGGTTGTCGTGAAGTACGCCCTGCCCGCTCCTTCTGATTTCAAGAACCGTTTCTACGTTGCCGGTGGTGGTGGTTTCCTCC
A. niger ATCC1015 CCAACCGGGGAAGGGTGACAAGGTTGTCGTGAAGTACGCCCTGCCCGCTCCTTCTGATTTCAAGAACCGTTTCTACGTTGCCGGTGGTGGTGGTTTCCTCC
A. niger      CCAACCGGGGAAGGGTGACAAGGTTGTCGTGAAGTACGCCCTGCCCGCTCCTTCCGACTTCAAGAACCGTTTCTACGTTGCCGGTGGTGGTGGTTTCCTCC
A. ruber CBS135680TACACCGGGGAAGGGTGACAAGGTTGTCGTGAAGTACGCCCTGCCCGCTCCTTCCGACTTCAAGAACCGTTTCTACGTTGCCGGTGGTGGTGGTTTCCTCC
A. terreus NIH2624CTATCTGGCAAGAGGAGCAGGGTTGTCGTGAAGTATGCTTCCCGAGCCGCTCCGACTTCAAGAACCGTTTCTATGTTGCCGGTGGTGGTGGTTTCCTCC
A. niger GH1     CCAACCGGGGAAGGGTGACAAGGTTGTCGTGAAGTACGCCCTGCCCGCTCCTTCCGACTTCAAGAACCGTTTCTACGTTGCCGGTGGTGGTGGTTTCCTCC

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
A. kawachi IFO4308CTGTCCAGCGATGCTACTGGCGGTCTCGAGTACGGTCTCGCTCCGGGGCCACCGACGCCGGCTACGACGCCCTTCTCTACAGCTATGATGAAGTCGTC
A. niger CBS513.88CTGTCCAGCGATGCTACTGGCGGTCTCGAGTACGGTCTCGCTCCGGGGCCACCGATGCCGGCTACGACGCCCTTCTCTACAGCTATGATGAAGTCGTC
A. niger ATCC1015 CTGTCCAGCGATGCTACTGGCGGTCTCGAGTACGGTCTCGCTCCGGGGCCACCGATGCCGGCTACGACGCCCTTCTCTACAGCTATGATGAAGTCGTC
A. niger      CTGTCCAGCGATGCCACGGTGGTCTCGAGTACGGTCTCGCTCCGGGGCCACCGATGCCGGCTACGACGCCCTTCTCTACAGCTATGATGAAGTCGTC
A. ruber CBS135680CTGTCCAGCGATGCCACGGTGGTCTCGAGTACGGTCTCGCTCCGGGGCCACCGATGCCGGCTACGACGCCCTTCTCTACAGCTATGATGAAGTCGTC
A. terreus NIH2624CTGTCCAGCGATGCCACGGTGGTCTCGAGTACGGTCTCGCTCCGGGGCCACCGATGCCGGCTACGACGCCCTTCTCTACAGCTATGATGAAGTCGTC
A. niger GH1     CTGTCCAGCGATGCTACTGGCGGTCTCGAGTACGGTCTCGCTCCGGGGCCACCGACGCCGGCTACGACGCCCTTCTCTACAGCTATGATGAAGTCGTC

      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
A. kawachi IFO4308TCTACGGCAACGGCTCGATCAACTGGGATGCTACTACATGTTCTCTACAGGCTCTTGGTGAAATGACCAAGATCGCCAAACCCCTGACCCGTGGTTT
A. niger CBS513.88TCTACGGCAACGGCTCGATCAACTGGGATGCTACTACATGTTCTCTACAGGCTCTTGGTGAGATGACCAAGATCGCCAAACCCCTGACCCGTGGTTT
A. niger ATCC1015 TTTATGGCAACGGCTCGATCAACTGGGATGCCACTTACATGTTTGGCTACAGGCTCTTGGTGAAATGACCAAGATCGCCAAACCCCTGACCCGTGGTTT
A. niger      TCTACGGCAACGGCTCTCAACTGGGATGCCACTTACATGTTTGGCTACAGGCTCTTGGTGAGATGACCAAGATCGCCAAACCCCTGACCCGTGGTTT
A. ruber CBS135680TCTACGGCAACGGATTCATCAACTGGGATGCCACATACATGTTTGGCTACAGGCTCTTGGTGAGATGACCAAGCTGGTAAAGTTTCTACCCAGGAGATT
A. terreus NIH2624TGATGGCAACGGCTCGATCAACTGGGATGCCACTATATGTTTGGGTACAGGCTCTTGGAGAGATGACCAAGATCGCCAAACCCCTGACCCGTGGTTT
A. niger GH1     TCTACGGCAACGGCTCGATCAACTGGGATGCTACTTACATGTTCTCTACAGGCTCTTGGTGAAATGACCAAGATCGCCAAACCCCTGACCCGTGGTTT

      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
A. kawachi IFO4308CTACGGCTCTCTCCAGCGACAAGAGATCTACACCTACTACGAGGGCTGTTCCGATGGTGGTCTGAGGGGTATGAGTCAGGTCACGCGCTGGGGAGATGAA
A. niger CBS513.88CTACGGCTCTCTCCAGCGACAAGAGATCTACACCTACTACGAGGGCTGTTCCGATGGTGGTCTGAGGGGTATGAGTCAGGTCACGCGCTGGGGAGATGAA
A. niger ATCC1015 CTACGGCTCTCTCCAGCGACAAGAGATCTACACCTACTACGAGGGCTGTTCCGATGGTGGTCTGAGGGGTATGAGTCAGGTCACGCGCTGGGGAGATGAA
A. niger      CTACGGCTCTCTCCAGCGACCAAGAGATCTACACCTACTACGAGGGGTGTTCTCCGAGGGTGGTCTGAGGGGTATGAGTCAGGTCACGCGCTGGGGAGATGAA
A. ruber CBS135680CTATGGCA-----CGGAAGACA-----AGGCTTACACCTACTACGAGGGATGCTCAGACGGTGGTCTGAGGGGTATGAGTCAGGTCACGCGCTGGGGAGAGAG
A. terreus NIH2624TTACGGCTCTCTGGGTGACCAAGATCTACACCTACTACGAGGGATGTTCTCGACGGCGCCCTGAGGGGTATGAGTCAGGTCACGCGCTGGGGAGAGAG
A. niger GH1     CTACGGCTCTCTCCAGCGACAAGAGATCTACACCTACTACGAGGGCTGTTCCGATGGTGGTCTGAGGGGTATGAGTCAGGTCACGCGCTGGGGAGATGAA

      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
A. kawachi IFO4308TATGACGGTGTATTGCGGGTGCCCTCGCTTCGCGCTTT-GCTCAGCAGCAGGTTCC-ACCACGTCTTCCCTGCCACTATTGAACACACCATGGACTACTA
A. niger CBS513.88TATGACGGTGTATTGCGGGTGCCCTCGCTTCGCGCTTT-GCTCAGCAGCAGGTTCC-ACCACGTCTTCCCTGCCACCATGAACACACCATGGATTACTA
A. niger ATCC1015 TATGACGGTGTATTGCGTGGTGCCCTCGCTTCGCGCTTT-GCTCAGCAGCAGGTTCC-ACCACGTCTTCCCTGCCACCATGAGCATACCATGGATTACTA
A. niger      TACGACGGGTGATTGCGGGTGCCCG-GCCTTCGCGCTCTCGCCAGCAGCAGGGGGGACACGGCTTCCCGGC-ACCATTGGACACACCATGGACTACTA
A. ruber CBS135680TACGATGGTGCCATTACCGGGTGCCCTGCTTCGCTTCGTTTC-GGCCAGCAACAGGTTTC-ACCATTGTGTTATCTCTCCCGCTCGAACATACGCAAGACTACTA
A. terreus NIH2624TACGACGGTGCGATTACCGGGTGCCCGGCGCTTCGCGTTT-GGTGACGAGCAGGTTTC-ATCACGTGTATCCCTCTGTGTGGAGAGACTCACGACTACTA
A. niger GH1     TATGACGGTGTATTGCGGGTGCCCTCGCTTCGCGCTTT-GCTCAGCAGCAGGTTCC-ACCACGTCTTCCCTGCCACTATTGAACACACCATGGACTACTA

      710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
A. kawachi IFO4308CCCTCCCCCTTGCAGCTTGACAAGATCGTCAACGCTACCAATTGAAGCCTGTGACCCCTCTCGACGGCGGTACCGATGGCGTTGTCTCCCGTACTGACCTT
A. niger CBS513.88CCCTCCCCCTTGCAGCTTGACAAGATCGTCAACGCTACCAATTGAAGCCTGTGACCCCTCTCGACGGCGGTACCGATGGCGTTGTCTCCCGTACTGACCTT
A. niger ATCC1015 CCCTCCCCCTTGCAGCTTGACAAGATCGTCAACGCTACCAATTGAAGCCTGTGACCCCTCTCGACGGCGGTACCGATGGCGTTGTCTCCCGTACTGACCTT
A. niger      CCCTCCCCCTTGTGAATCGAGAAGATCGTCAACGCTACCAATTGAAGCCTGTGACCCCTCTCGACGGCGGTACCGATGGCGTTGTCTCCCGTACTGACCTT
A. ruber CBS135680CCCCCTCCCTGTGAATTGGAACAAGATTGCAAGCGCCACCATGCGCCCTGTGACCCCTCTCGACGGACGGACTGATGGTGTCTATCTCCCGTACTGACCTT
A. terreus NIH2624CCCAACCCCATGTGAGCTGGACAAGATCGTGAATGCGCAATTTGCTGCTGTGACCCCTCTCGATGGCGCGACGGATGGCGTGTGTACGGAATGATCTGT
A. niger GH1     CCCTCCCCCTTGCAGCTTGACAAGATCGTCAACGCTACCAATTGAAGCCTGTGACCCCTCTCGACGGCGGTACCGATGGCGTTGTCTCCCGTACTGACCTT

      810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
A. kawachi IFO4308TGATGCTGAACCTTCAACCTCACCTCCATCATTGGCGAGTCCCTACTACTGCGCTGAGCAGAACTACACCTCCCTGGGCTTTGGCTTCAGCAAGCGT---G
A. niger CBS513.88TGATGCTGAACCTTCAACCTCACCTCCATCATTGGCGAGTCCCTACTATTGCGCTGAACAAAACCTACACCTCCCTGGGCTTCGGCTTCAGCAAGCGC---G
A. niger ATCC1015 TGATGCTGAACCTTCAACCTCACCTCCATCATTGGCGAGTCCCTACTACTGCTGCTGAGAGAACTACACCTCCCTGGGCTTCGGCTTCAGCAAGCGC---G
A. niger      TGATGCTGAACCTTCAACCTCACCTCCCTCACCGGACCCCTACTACTGCGCGCCCGAGAACTACACCTCCCTGGGCTTCGGCTTTAAGAAAGCGCCAAAG
A. ruber CBS135680TGACAGCTTCGTTCAACCTGACCTCGATCTTGGCGAGTCTGACCACTGCGCGCGAGACAGCAGCCTCCCTCGGATTTGCTGATCTCAGCAAGCGAG
A. terreus NIH2624TGCAAGCTGAACCTTCAACCTGCTCCTCATCATCGCGAGCCATACTACTGTGCGGAACAGAAATTAACATCCCTTGGCTTTGGCTTCAGCAAGCGCG-A
A. niger GH1     TGCATGCTGAACCTTCAACCTCACCTCCATCATTGGCGAGTCCCTACTACTGCGCTGAACAGAACTACACCTCCCTGGGCTTTGGCTTCAGCAAGCGT---G

      910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
A. kawachi IFO4308CTGA-----GGGCAGCACTACTAGCTACCAAGCCGCCAGAACGGCAGCGTTACCGCTGAGGGCGTTGCTCTCGCCAGGCGCATCTACG
A. niger CBS513.88CCGA-----AGGCAGCACTACAGCTACAGCCTGCCAGAACGGCAGCGTTACCGCTGAGGGCGTTGCTCTCGCCAGGCGCATCTACG

```



A. niger ATCC1015 CCGA-----AGGCAGCACTACTAGCTACCAGCCGCCAGAAATGGCTCCGTCACTGCCAAGGTGTCGCCCTCGCCAGGCCATCTACG  
 A. niger CCAA-----AGGCAGCAACCCAGCTACAGCCGCCAGAAATGGCAACCATCACCCGCCAGSTGTGCGCTTTGGCCAGGCCCKTGTACG  
 A. ruber CBS135680 CTGA-----GGGCAGCAACCCAGCTACAGCCGTGAGCAGAAATGGCACTGTGACTGCTGAAGGTGTAGCCGTTCGCCAGGCCATCTACG  
 A. terreus NIH2624 TTGAACAAGCGCCAGGCACCGGGAGCTCCAGCCAGCTATCAGCCGGAGCAGAAATGGGAATGTCTCTGCGGAAGCGTGGCTGTCCGCCAGGCCATCTACG  
 A. niger GH1 CTGA-----AGGCAGCACTACTAGCTACCAGCCGCCAGAAACGGCAGCTCACCGCTGAGGGTGTTCCTCTCGCCAGGCCATCTACG  
 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100  
 A. kawachi IFO4308 ACGGCTCTCCAGACTCTAACGGCAAGCGTGCCCTACCTCTCGTGGCAGATCGCCGCTGAGCTGTCCGATGGTGACACCGAGTACGACTCCACCACTGACTC  
 A. niger CBS513.88 ACGGCTCTCCAGACTCTAACGGCAAGCGTGCCCTACCTCTCGTGGCAGATCGCCGCGGAGCTGTCCGACGGTGACACCGAGTACGACTCCACCACTGACTC  
 A. niger ATCC1015 ACGGCTCTCCAGACTCTAACGGCAAGCGTGCCCTACCTCTCGTGGCAGATCGCCGCGGAGCTGTCTGACGGTGACACCGAGTATGACTCCACCACTGACTC  
 A. niger ATGGTGTGACGACTCCGAGGGMAAGCGCGCTACCTGTCTGAGCAGATCGCCGCGGAGCTTTTTCGATGCTGACACCACTATGACTCGACCAACCGACTC  
 A. ruber CBS135680 ACGGCTCTCCAGACTCTAACGGCAAGCGTGCCCTACCTCTCGTGGCAGATCGCCGCTGAGCTGAGCTGAGCGACGCGACCCAGGATACAAACGACACTGGCAA  
 A. terreus NIH2624 ACGGCTCTCCAGACTCTAACGGCAAGCGTGCCCTACCTGTCTGAGCAGATTCGCTCGGAGCTGAGTGTGCAACCAACCGACTACAACTCCGACACGAGTTC  
 A. niger GH1 ACGGCTCTCCAGACTCTAACGGCAAGCGTGCTTACCTCTCGTGGCAGATCGCCGCTGAGCTGTCCGATGGTGACACCGAGTACGACTCCACCACTGACTC  
 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200  
 A. kawachi IFO4308 CTGGACTCTGAGCATCCCTCTACCGGTGGCGAGTACGTGCAAAATTCGTGCAAGCTCTCTCAACATCGATAACCTGGAGAACCTCGCAACCTCTACCTAC  
 A. niger CBS513.88 CTGGACTCTGAGCATCCCTCTACCGGTGGCGAGTACGTGCAAAATTCGTGCAAGCTCTCTCAACATCGATAACCTGGAGAACCTCGCAACCTCTACCTAC  
 A. niger ATCC1015 CTGGACTCTGAGCATCCCTCTACCGGTGGCGAGTACGTGCAAAATTCGTGCAAGCTCTCTCAACATCGATAACCTGGAGAACCTCGCAACCTCTACCTAC  
 A. niger CTGGACCTCTGATATCCCTCTACCGGTGGCGAATATGTGCAAAATTCGTGCAAGCTCTCTCAACATCGATAACCTCTGGACCTCAATGGTGTCACTAC  
 A. ruber CBS135680 CTGGAGCTCAGCATCCCTCTACCGGTGGCGAGTATGTCACTAAGTTTGTACAGCTGTGGACATCGCAACCTCTCCCAACCTGGACCAACCTTACCTAC  
 A. terreus NIH2624 CTGGAGCTCAGTATCCCTCTACCTGGTGGCGAGTATGTCACTAAGTTTGTACAGCTGTGGACATCGCAACCTCTCCCAACCTGGACCAACCTTACCTAC  
 A. niger GH1 CTGGACTCTGAGCATCCCTCTACCGGTGGCGAGTACGTGCAAAATTCGTGCAAGCTCTCTCAACATCGATAACCTGGAGAACCTCGCAACCTCTACCTAC  
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300  
 A. kawachi IFO4308 GACACCTGGTGCAGCTGGATGAACATCGGTATGATTGCTACATTGACAGTCTCCAGAACCCGTGATCGACCTCACCACTCTCAAGGAATCCGGTGGTA  
 A. niger CBS513.88 GACACCTGGTGCAGCTGGATGAACATCGGTATGATTGCTACATTGACAGTCTCCAGAACCCGTGATCGACCTCACCACTCTCAAGGAATCCGGTGGTA  
 A. niger ATCC1015 GACACCTGGTGCAGCTGGATGAACATCGGTATGATTGCTACATTGACAGTCTCCAGAACCCGTGATCGACCTCACCACTCTCAAGGAATCCGGTGGTA  
 A. niger GACACCTCGTTGACTGGATGAACACCGGATGATCCGCTACATCGACAGTCTCCAGAACCCGTGATCGATTGACAGCTCTCCAGAACCTCTGGCGGCA  
 A. ruber CBS135680 GACACCTCGTGCAGCTGGATGAACATCGGTATGATTGCTACATTGACAGTCTCCAGAACCCGTGATCGATTGACAGCTCTCCAGAACCTCTGGCGGGA  
 A. terreus NIH2624 GACACCTCGTGCAGCTGGATGAACATCGGTATGATTGCTACATTGACAGTCTCCAGAACCCGTGATCGATTGACAGCTCTCCAGAACCTCTGGCGGGA  
 A. niger GH1 GACACCTGGTGCAGCTGGATGAACATCGGTATGATTGCTACATTGACAGTCTCCAGAACCCGTGATCGACCTCACCACTCTCAAGGAATCCGGTGGTA  
 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400  
 A. kawachi IFO4308 AGATGATCCACTACCACGGTGAATCCGACCCAGTATCCCCACCGCCTCGTCTGTCCACTACTGGCAGGCTGTCCGTGAGGCCATGATCCCCAACACAC  
 A. niger CBS513.88 AGATGATCCACTACCACGGTGAATCCGACCCAGTATCCCCACCGCCTCGTCTGTCCACTACTGGCAGGCTGTCCGTGAGGCCATGATCCCCAACACAC  
 A. niger ATCC1015 AGATGATCCACTACCACGGTGAATCCGACCCAGTATCCCCACCGCCTCGTCTGTCCACTACTGGCAGGCTGTCCGTGAGGCCATGATCCCCAACACAC  
 A. niger AGATGATTCCTACTACCACGGTGAATCCGACCCAGTATCCCCACCGCCTCGTCTGTCCACTACTGGCAGGCTGTCCGTGAGGCCATGATCCCCAACACAC  
 A. ruber CBS135680 AGTCTCTCACTACCACGGTGAATCCGACCCAGTATCCCCACCGCCTCGTCTGTCCACTACTGGCAGGCTGTCCGTGAGGCCATGATCCCCAACACAC  
 A. terreus NIH2624 AGTCTCTCACTACCACGGTGAATCCGACCCAGTATCCCCACCGCCTCGTCTGTCCACTACTGGCAGGCTGTCCGTGAGGCCATGATCCCCAACACAC  
 A. niger GH1 AGATGATCCACTACCATGGTGAATCCGACCCAGTATCCCCACCGCCTCGTCTGTCCACTACTGGCAGGCTGTCCGTGAGGCCATGATCCCCAACACAC  
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500  
 A. kawachi IFO4308 CTACACCCAGTCCCTGCAGGATATGTCCGACTGGTACACAGCTCTACCTCGTCCCCGGCGCTGCTCACTGCGGCCACCACTCTCCAGCCCTGGGCTTAC  
 A. niger CBS513.88 CTACACCCAGTCCCTGCAGGAGATGTCCGACTGGTACACAGCTCTACCTCGTCCCCGGCGCTGCTCACTGCGGCCACCACTCTCCAGCCCTGGGCTTAC  
 A. niger ATCC1015 CTACACCCAGTCCCTGCAGGAGATGTCCGACTGGTACACAGCTCTACCTCGTCCCCGGCGCTGCTCACTGCGGCCACCACTCTCCAGCCCTGGGCTTAC  
 A. niger CTACACGACTCCCTGCAGGAGTGGCGACTGGTACCTGCTACCTGATCCCCGGCGCTGCCACTGCGGGAACCACTCTCCAGCCCTGGGCTTAC  
 A. ruber CBS135680 CCAAGGAAGATCCCTGCAGGCCCTGCAGGACTGGTACCAATTTACCTGATCCCTGGTGGCGCCACTGCGGTAGCAACACTCTCCAGCCCTGGGCTTAC  
 A. terreus NIH2624 CCGCGCGAGAGTCTCAAGCAGATGGATGATTGGTACCAATTTACCTGATCCCTGGTGGCGCCACTGCGGTAGCAACACTCTCCAGCCCTGGGCTTAC  
 A. niger GH1 CTACACCCAGTCCCTGCAGGATATGTCCAACTGGTACACAGCTCTACCTCGTCCCCGGCGCTGCTCACTGCGGTAGCAACCTCTCCAGCCCTGGGCTTAC  
 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600  
 A. kawachi IFO4308 CCGGAGGACAACATGGAGATCATGATCGACTGGGTGAGAAACGGCAACAGCCTTCCCG  
 A. niger CBS513.88 CCGGAGGACAACATGGAGATCATGATCGACTGGGTGAGAAACGGCAACAGCCTTCCCG  
 A. niger ATCC1015 CCGGAGGACAACATGGAGATCATGATCGACTGGGTGAGAAACGGCAACAGCCTTCCCG  
 A. niger CCGGAGGACAATATGGAGATCATGATCAACTGGGTGAGAAACGGGTCAAGCCTTCCCGCTCTCAACGCCACCGTCTCTTCCGGTACTTATGAGGGTGAAGA  
 A. ruber CBS135680 CCAAGAAACAACATGGAGACCATCATCACTGGGTGAGAAACGGGTCAAGCCTTCCCG  
 A. terreus NIH2624 CCGAAAGACAACATGGAGATCATGATCAACTGGGTGAGAAACGGGTCAAGCCTTCCCG  
 A. niger GH1 CCGGAGGACAACATGGAGATCATGATCGACTGGGTGAGAAACGGCAACAGCCTTCCCG  
 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700  
 A. kawachi IFO4308 CCTCAACGCCACCGTCTCCTCCGGTACCTATGCTGGTGAGACCCAGATGCTTTGC  
 A. niger CBS513.88 CCTCAACGCCACCGTCTCCTCCGGTACCTATGCTGGTGAGACCCAGATGCTTTGC  
 A. niger ATCC1015 CCTCAACGCCACCGTCTCCTCCGGTACCTATGCTGGTGAGACCCAGATGCTTTGC  
 A. niger CCGCAGATGCTGTGCCAGTGCCTCTCTGCTCCCTCTGGACAGCG TCTCAACGCCACCGTCTCCTCCGGTACCTATGCTGGTGAGACCCAGATGCTTTGC  
 A. ruber CBS135680 TCTCAACGCCACCGTCTCCTCCGGTACCTATGCTGGTGAGACCCAGATGCTTTGC  
 A. terreus NIH2624 TCTCAATGCCACCGTCTCCTCCGGTACCTATGCTGGTGAGACCCAGATGCTTTGC  
 A. niger GH1 CCTCAACGCCACCGTCTCCTCCGGTACCTATGCTGGTGAGACCCAGATGCTTTGC  
 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800  
 A. kawachi IFO4308 CAGTGGCCCTTCTCGTCCCTCTGGAAACAGCAAC TCCAGCTTCTCTGTGTTCACGATTCGAAGTCCCTTGTCTACTTTGGGACTACACTTTTGTGCTT  
 A. niger CBS513.88 CAGTGGCCCTTCTCGTCCCTCTGGAAACAGCAAC TCCAGCTTCTCTGTGTTCACGATTCGAAGTCCCTTGTCTACTTTGGGACTACACTTTTGTGCTT  
 A. niger ATCC1015 CAGTGGCCCTTCTCGTCCCTCTGGAAACAGCAAC TCCAGCTTCTCTGTGTTCACGATTCGAAGTCCCTTGTCTACTTTGGGACTACACTTTTGTGCTT  
 A. niger CAGTGGCCCTTCTCGTCCCTCTGGAAACAGCAAC TCCAGCTTCTCTGTGTTCACGATTCGAAGTCCCTTGTCTACTTTGGGACTACACTTTTGTGCTT  
 A. ruber CBS135680 CAGTGGCCCTTCTCGTCCCTCTGGAAACAGCAAC TCCAGCTTCTCTGTGTTCACGATTCGAAGTCCCTTGTCTACTTTGGGACTACACTTTTGTGCTT  
 A. terreus NIH2624 CAGTGGCCCTTCTCGTCCCTCTGGAAACAGCAAC TCCAGCTTCTCTGTGTTCACGATTCGAAGTCCCTTGTCTACTTTGGGACTACACTTTTGTGCTT  
 A. niger GH1 CAGTGGCCCTTCTCGTCCCTCTGGAAACAGCAAC TCCAGCTTCTCTGTGTTCACGATTCGAAGTCCCTTGTCTACTTTGGGACTACACTTTTGTGCTT  
 1810 1820  
 A. kawachi IFO4308 TCAAGATGCCCGTTTTCTAA  
 A. niger CBS513.88 TCAAGATGCCCGTTTTCTAA  
 A. niger ATCC1015 TCAAGATGCCCGTTTTCTAA  
 A. niger TCAAGATGCCCGTTTTCTAA  
 A. ruber CBS135680 TCAAGATGCCCGTTTTCTAA  
 A. terreus NIH2624 TCAAGATGCCCGTTTTCTAA  
 A. niger GH1 TCAAGATGCCCGTTTTCTAA

Figura 25. Alineamiento múltiple de la secuencia nucleotídica de *A. niger* GH1 las con las seis secuencias de tanasas fúngicas que presentaron mayor identidad con la tanasa de *A. niger* GH1.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
A. kawachi IFO4308 S S L S D L C T V S N V Q S A L P S N G T L L G I N L I P S A V T A N T V T D A S S G - M G S S - - - - - G S Y D Y C N V T V T Y T H T G K G D K V V V K Y A L P A P S D F K N R F Y V A G G G G F S
A. niger CBS513.88 T S L S D L C T V S N V Q S A L P S N G T L L G I D L I P S A V T A N T V T D A S S G - M G S S - - - - - G S Y D Y C N V T V T Y T H T G K G D K V V V K Y A L P A P S D F K N R F Y V A G G G G F S
A. niger ATCC1015 T S L S D L C T V S N V Q S A L P S N G T L L G I N L I P S A V T A N T V T D A S S G - M G S S - - - - - G S Y D Y C N V T V T Y T H T G K G D K V V V K Y A L P A P S D F K N R F Y V A G G G G F S
A. niger_      - S L S D V C T V S N V Q S A L P S N G T L L G I D L I P S A V T A N T V T D A T A G - M G S T - - - - - T T Y D Y C N V T V T Y T H T G K G D K V V V K Y A L P A P S D F K N R F Y V A G G G G F S
A. ruber CBS135680 - S L S D V C T V S N V R A A L P A N G T L L G M D I P S A V T A G A V Y N A S A G - M G S T - - - - - E T Y T Y C N V T V A Y T H T G K G D K V V I K Y A F P K P S D F N S R F Y V A G G G G F S
A. terreus NIH2624 T S L V D L C T V S H V Q A A I P A N G T L L G I N L I P S S V T A S P V Y N A T V G G M G S T T S S A A T Y D Y C N V T V A Y T H T G K G D E V V V K Y A F P S P S D F K S R F Y V A G G G G F S
A. niger GH1      T S L S D L C T V S N V Q S A L P S N G T L L G I N L I P S A V T A N T V T D A S S G - M G S S - - - - - G S Y D Y C N V T V T Y T H T G K G D K V V V K Y A L P A P S D F K N R F Y V A G G G G F S

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
A. kawachi IFO4308 L S S D A T G G L E Y G A A S G A T D A G Y D A F S Y S Y D E V V L Y G N G S I N W D A T Y M F S Y Q A L G E M T K I A K P L T R G F Y G L S S D K K I Y T Y Y E G C S D G G R E G M S Q V Q R W G D E
A. niger CBS513.88 L S S D A T G G L E Y G A A S G A T D A G Y D A F S Y S Y D E V V L Y G N G S I N W D A T Y M F S Y Q A L G E M T K I A K P L T R G F Y G L S S D K K I Y T Y Y E G C S D G G R E G M S Q V Q R W G D E
A. niger ATCC1015  L S S D A T G G L E Y G A A S G A T D A G Y D A F S Y S Y D E V V L Y G N G S I N W D A T Y M F S Y Q A L G E M T K I A K P L T R G F Y G L S S D K K I Y T Y Y E G C S D G G R E G M S Q V Q R W G D E
A. niger_      L S S D A T G G L E Y G A A S G A T D A G Y D A F S Y S Y D E V V L Y G N G F I N W D A T N M F Y Q A L G E M T K I G K P L T Q G F Y G L S S D K K I Y T Y Y E G C S D G G R E G M S Q V H R W G D E
A. ruber CBS135680 L S S D A T G G L E Y G A V G G A T D A G Y D A F S N S Y D E V V L Y G N G S I N W D A T Y M F A Y Q A L G E M T K I G K V L T Q G F Y G T - - E D K V Y T Y Y E G C S D G G R E G M S Q V Q R W G D E
A. terreus NIH2624 L S S D A T G G L Y G A A G G A T D A G Y D A F S N S Y D E V V L Y G N G S I N W D A T Y M F Y Q A L G E M T K I G K P L A R G F Y G L S G D K T I Y T Y Y E G C S D G G R E G M S Q V Q R W G D E
A. niger GH1      L S S D A T G G L E Y G A A S G A T D A G Y D A F S Y S Y D E V V L Y G N G S I N W D A T Y M F S Y Q A L G E M T K I A K P L T R G F Y G L S S D K K I Y T Y Y E G C S D G G R E G M S Q V Q R W G D E

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
A. kawachi IFO4308 Y D G V I A G A P A F R F A Q Q Q V H H V F P A T I E H T M D Y Y P P P C E L D K I V N A T I E A C D P L D G R T D G V V S R T D L C M L N F N L T S I I G E S Y Y C A E Q N Y T S L G F G F S K R - -
A. niger CBS513.88 Y D G V I A G A P A F R F A Q Q Q V H H V F P A T I E H T M D Y Y P P P C E L D K I V N A T I E A C D P L D G R T D G V V S R T D L C M L N F N L T S I I G E S Y Y C A E Q N Y T S L G F G F S K R - -
A. niger ATCC1015  Y D G V I A G A P A F R F A Q Q Q V H H V F P A T I E H T M D Y Y P P P C E L D K I V N A T I E A C D P L D G R T D G V V S R T D L C M L N F N L T S I I G E P Y Y C A A E N Y T S L G F G F S K R - -
A. niger_      Y D G V I A G A R P S A L A Q Q Q G G P R L P G T I G H T M D Y Y P P P C E L E K I V T I E T I A C D P L D G R T D G V V S R T D L C M L N F N L T S L I G T P Y Y C A A Q N Y T S L G F G L R K R K - -
A. ruber CBS135680 Y D G A I T G A P A F R F G Q Q Q V H H V Y S S A V E H T Q D Y Y P P P C E L D K I V N A T I A C D P L D G R T D G V I S R T D L C L R F N L T S I I G E S Y Y C A A E T S T S L G F G F S K R - -
A. terreus NIH2624 Y D G A I T G A P A F R F G Q Q Q V H H V Y P S A V E K T H D Y Y P P P C E L D K I V N A T I A C D P L D G R T D G V V S R T D L C L N F N L T S I I G E P Y Y C A E Q N Y T S L G F G F S K R G L
A. niger GH1      Y D G V I A G A P A F R F A Q Q Q V H H V F P A T I E H T M D Y Y P P P C E L D K I V N A T I E A C D P L D G R T D G V V S R T D L C M L N F N L T S I I G E S Y Y C A E Q N Y T S L G F G F S K R - -

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
A. kawachi IFO4308 - - - - - A E G S T T S Y Q P A Q N G S V T A E G V A L A Q A I Y D G L H D S N G K R A Y L S W Q I A A E L S D G D T E Y D S T T D S W T L S I P S T G G E Y Y T K F V Q L L N D I N L N D N V T Y D
A. niger CBS513.88 - - - - - A E G S T T S Y Q P A Q N G S V T A E G V T L A Q A I Y D G L H D S N G K R A Y L S W Q I A A E L S D G D T E Y D S T T D S W T L S I P S T G G E Y Y T K F V Q L L N D I N L N D N V T Y D
A. niger ATCC1015  - - - - - A E G S T T S Y Q P A Q N G S V T A E G V A L A Q A I Y D G L H D S N G K R A Y L S W Q I A A E L S D G D T E Y D S T T D S W T L S I P S T G G E Y Y T K F V Q L L N D I N L N D N V T Y D
A. niger_      - - - - - A K G S T T S Y Q P A Q N G T I T R R X V A L A Q A X Y D G L H D S E G K R A Y L S W Q I A A E L F A D A T T Y D S T T D S W T L S I P S T G G E Y Y T K F V Q L L N D I N L N D N V T Y D
A. ruber CBS135680 - - - - - A E G S T T S Y Q P E Q N G T V T A E G V A V A Q A I Y D G L H N S N G E R A Y L S W Q I G S E L S D A T T E Y N N D T K W E L S I P S T G G E Y Y T K F V Q L L N D I N L S D L N G V T Y D
A. terreus NIH2624 N K R Q A P S G S S T S Y Q P E Q N G T V S A E G V A V A Q A I Y D G L H N S G Q R A Y L S W Q I A S E L S D A T T D Y N S D T S W E L S I P S T G G E Y Y T K F V Q L L D I N L S N D N V T Y D
A. niger GH1      - - - - - A E G S T T S Y Q P A Q N G S V T A E G V A L A Q A I Y D G L H D S N G K R A Y L S W Q I A A E L S D G D T E Y D S T T D S W T L S I P S T G G E Y Y T K F V Q L L N D I N L N D N V T Y D

      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
A. kawachi IFO4308 T L V D W M N I G M I R Y I D S L Q T T V I D L T T F K S G G K M I H Y H G E S D P S I P T A S S V H Y W Q A V R Q A M Y P N T T Y T Q S L Q D M S D W Y Q L Y L V P G A A H C G T N S L Q P G P Y
A. niger CBS513.88 T L V D W M N I G M I R Y I D S L Q T T V V D L T T F Q S G G K M I H Y H G E S D P S I P T A S S V H Y W Q V R Q A M Y P N T S Y T Q S L K E M S D W Y Q L Y L V P G A A H C G T N D L Q P G P Y
A. niger ATCC1015  T L V D W M N I G M I R Y I D S L Q T T I P D L T T F Q S G G K M I H Y H G E S D P S I P T A S S V H Y W Q A V R Q A M Y P N T T Y T Q S L K E M S D W Y Q L Y L V P G A A H C G T N D L Q P G P Y
A. niger_      T L V D W M N I G M I R Y I D S L Q T T V V D L D F Q K S G G K M I H Y H G E S D P S I P T A S S V H Y W Q A V R Q A M Y P N V T Y T D S L K R M A D W Y Q L Y L P G A A H C G T N S L Q P G P Y
A. ruber CBS135680 T L V D W M N I G M V R Y M D S L Q T T Y P D L T T F T K S G G K L L H Y H G E S D P S I P A A S S V H Y W Q A V R S V M Y G N L T Q E S L E A L E D W Y Q F Y L I P G A A H C G T N L Q P G P Y
A. terreus NIH2624 T L V D W M N I G M V R Y M D S L Q T T I P D L T T F Q S G G K L L H Y H G E S D P S I P A A S S V H Y W Q S V R S V M Y P K L T P A E S L K Q M D D W Y Q F Y L I P G A A H C G T N D L Q P G P W
A. niger GH1      T L V D W M N I G M I R Y I D S L Q T T V I D L T T F K S G G K M I H Y H G E S D P S I P T A S S V H Y W Q S V R Q A M Y P N T T Y T Q S L Q D M S N W Y Q L Y L V P G A A H C G T N S L Q P G P Y

      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
A. kawachi IFO4308 E D N M E I M I D W V E N G N K P S R L N A T V S S G T Y A G E T Q M L C W P S R P L W N S S - - - - - F S C V H D S K S L A T W D Y T F D A F - K
A. niger CBS513.88 E D N M E I M I D W V E N G N K P S R L N A T V S S G T Y A G E T Q M L C W P S R P L W T S N S - - - - - F S C V H D S K S L A T W D Y T F D A F - K
A. niger ATCC1015  E D N M E I M I D W V E N G N K P S R L N A T V S S G T Y A G E T Q M L C W P S R P L W T S N S - - - - - F S C V H D S K S L A T W D Y T F D A F - K
A. niger_      E D N M E I M I N W V E N G V K P S R L N A T V S S G T Y E G E T Q M L C Q C P L V P L W T S A T P P S P P V M L V R P C S A S G L P V P S G P A T P A S L V S M T P S L L L G T T L L T L S R
A. ruber CBS135680 Q N N M E T I I N W V E N G V K P S R L N A T V S S G T Y A G E T Q M L C W P T R P L W K G N S S - - - - - F S C V N D Q E S I D S W T Y S F D A F - K
A. terreus NIH2624 E S N M E I M I N W V E N G V K P S R L N A T V S S G T Y A G E T Q M L C W P T R P L W H G N S S - - - - - F D C V H D K E S I D S W T Y S F P A F - K
A. niger GH1      E D N M E I M I D W V E N G N K P S R L N A T V S S G T Y A G E T Q M L C W P S R P L W N S S - - - - - F S C V H D S K S L A T W D Y T F D A F - K

.....
A. kawachi IFO4308 M P V F -
A. niger CBS513.88 M P V F -
A. niger ATCC1015 M P V F -
A. niger_      C P F F K
A. ruber CBS135680 I P V Y -
A. terreus NIH2624 V P V Y -
A. niger GH1      M P V F -

```

**Figura26.** Alineamiento múltiple de la secuencia de *A. niger* GH1 las con las seis secuencias de tanasas fúngicas que presentaron mayor identidad con la tanasa de *A. niger* GH1.

Con estos dos alineamientos se determinó que la secuencia de aminoácidos de la tanasa de *A. niger* GH1 mostró identidades de 78.6-99.4% con respecto a las 6 tanasas fungicas más similares: la tanasa de *Aspergillus kawachii* IFO 4308 (GenBank número de acceso GAA91900.1, 99.4 %), la tanasa de *A. niger* CBS 513.88 (GenBank número de acceso XP\_001402486.1, 98.0 %), la tanasa de *A. niger* ATCC 1015 (GenBank número de acceso EHA22262.1, 97.1 %), la tanasa de *Aspergillus terreus* NIH2624 (GenBank número de acceso XP\_001216558.1, 80.0 %), la tanasa de *A. niger* (Gen Bank número

de acceso ABX89592.1, 79.2 %), y la tanasa y feruloil esterasa de *Aspergillus ruber* CBS 135680 (Gen Bank número de acceso EYE96818.1, 78.6 %), con identidades en las secuencia nucleotídicas que van en un intervalo de 73.3 a 98.6% para las mismas tanasas fúngicas.

En la Figura 27 se muestra el alineamiento entre la secuencia de la tanasa de *A. niger* GH1 y la secuencia de la tanasa más relacionada (*A. kawachi* IFO4308). La tanasa de *A. niger* GH1 mostró tres diferencias, todas conservativas (T20S, S462A, y N482D).

Sequence ID: lcl|259153Length: 562Number of Matches: 1  
Range 1: 1 to 562[Graphics](#) Next Match Previous Match  
Alignment statistics for match #1

NW	Score	Identities	Positives	Gaps
2999		559/562 (99%)	562/562 (100%)	0/562 (0%)

Query	1	TSLSDLCTVSNVQSALPSNGTLLGINLIPSAVTANTVTDASSGMSSGSYDYCNVTVTYT	60
+SLSDDLCTVSNVQSALPSNGTLLGINLIPSAVTANTVTDASSGMSSGSYDYCNVTVTYT			
Sbjct	1	SLSDDLCTVSNVQSALPSNGTLLGINLIPSAVTANTVTDASSGMSSGSYDYCNVTVTYT	60
Query	61	HTGKGDKVVVKYALPAPSDFKNRFYVAGGGGFLSSDATGGLEYGAASGATDAGYDAFSY	120
Sbjct	61	HTGKGDKVVVKYALPAPSDFKNRFYVAGGGGFLSSDATGGLEYGAASGATDAGYDAFSY	120
Query	121	SYDEVVLYGNGSINWDATYMFYSYQALGEMTKIAKPLTRGFYGLSSDKKIYTYEYEGCSDGG	180
Sbjct	121	SYDEVVLYGNGSINWDATYMFYSYQALGEMTKIAKPLTRGFYGLSSDKKIYTYEYEGCSDGG	180
Query	181	REGMSQVQRWGDEYDGVIAGAPAFRFAQQQVHHVFPATIEHTMDYPPPCELDKIVNATI	240
Sbjct	181	REGMSQVQRWGDEYDGVIAGAPAFRFAQQQVHHVFPATIEHTMDYPPPCELDKIVNATI	240
Query	241	EACDPLDGRDGVVSRDLCMLNFNLTISIIGESYYCAEQNYTSLGFGFSKRAEGSTTSYQ	300
Sbjct	241	EACDPLDGRDGVVSRDLCMLNFNLTISIIGESYYCAEQNYTSLGFGFSKRAEGSTTSYQ	300
Query	301	PAQNGSVTAEGVALAQAIYDGLHDSNGKRAYLSWQIAAELSDGDTEYDSTTDSWTLSIPS	360
Sbjct	301	PAQNGSVTAEGVALAQAIYDGLHDSNGKRAYLSWQIAAELSDGDTEYDSTTDSWTLSIPS	360
Query	361	TGGEYVTKFVQLLNIDNLENLDNVTYDTLVDWMNIGMIRYIDSLQTTVIDLTTTFKESGGK	420
Sbjct	361	TGGEYVTKFVQLLNIDNLENLDNVTYDTLVDWMNIGMIRYIDSLQTTVIDLTTTFKESGGK	420
Query	421	MIHYHGESDPSIPTASSVHYWQSVRQAMYPNTTYTQSLQDMSNWYQLYLVPGAACGTNS	480
Sbjct	421	MIHYHGESDPSIPTASSVHYWQAVRQAMYPNTTYTQSLQDMSWYQLYLVPGAACGTNS	480
Query	481	LQPGYPEDNMEIMIDWVENGNKPSRLNATVSSGTYAGETQMLCQWPSRPLWNSNSFSFSC	540
Sbjct	481	LQPGYPEDNMEIMIDWVENGNKPSRLNATVSSGTYAGETQMLCQWPSRPLWNSNSFSFSC	540
Query	541	VHDSKSLATWDYTFDAFKMPVF	562
Sbjct	541	VHDSKSLATWDYTFDAFKMPVF	562

**Figura 27.** Alineamiento entre la secuencia de la tanasa de *A. niger* GH1 y la secuencia de la tanasa de *A. kawachi* IFO4308. En rojo se muestran las tres diferencias conservativas entre las dos tanasas (T20S, S462A, y N482D).

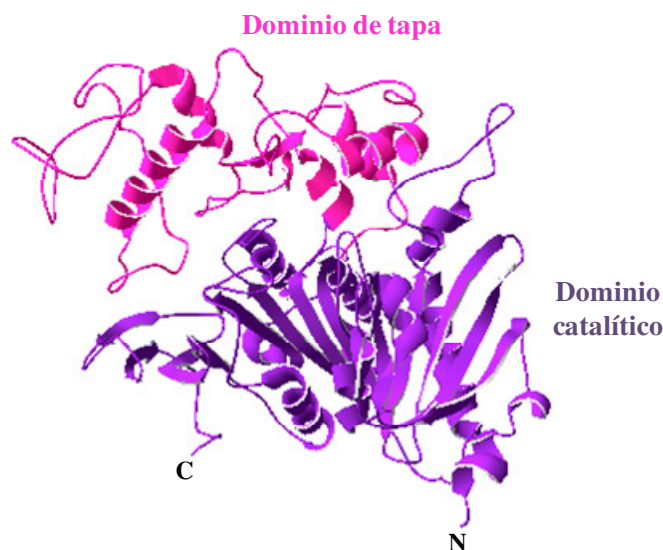
### 7.1.5. Análisis computacional de la secuencia aminoacídica de la tanasa de *A. niger* GH1

El análisis con *Pfam* mostró que la secuencia de la tanasa de *A. niger* GH1 tiene un dominio del residuo 53 al 545 que pertenece a la familia Tanasa PF07519 en donde se agrupan otras tanasas, feruloil estearasas y varias proteínas de bacterias de función desconocida. Esta familia es un miembro del clan AB\_hidrolasa (CL0028) cuyo dominio catalítico se encuentra en una amplia gama de enzimas, ya que este clan contiene 67 miembros. Actualmente en la familia PF07519 están reportadas 757 secuencias aminoacídicas distribuidas en 345 especies, 375 (49.5%) secuencias son de bacterias (271 especies, 78.6%) y 382 (50.5%) de eucariotas (74 especies, 21.4%). De entre los eucariotas destacan los hongos con 365 secuencias (48.2% del total de las secuencias) distribuidas en 69 especies (20.0%). En la familia PF07519 se encuentran descritas 15 arquitecturas de organización de dominios, presentando la tanasa de *A. niger* GH1 la arquitectura más sencilla de un único dominio. La familia PF07519 sólo tiene descrita una estructura tridimensional determinada experimentalmente por cristalografía de rayos X (clave Protein Data Bank 3WMT), que corresponde a una feruloil estearasa de *A. oryzae* (Suzuki *et al.*, 2014).

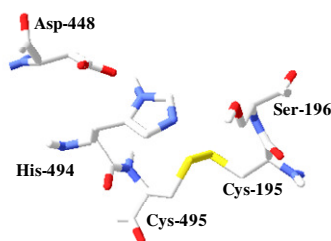
El programa *Phyre*<sup>2</sup> realizó un modelo molecular con todos los aminoácidos de la tanasa de *A. niger* GH1, 512 residuos (91%) fueron modelados en base a la estructura 3WMT debido a que el programa consideró a 3WMT como un homólogo real de la tanasa de *A. niger* GH1 con un 100% de confiabilidad. Además 50 residuos (9%) fueron modelados mediante técnicas de *ab initio*. El modelo molecular de la tanasa de *A. niger* GH1 (Figura 28 A) mostró la presencia de 16 hélices alfa y 16 hojas beta que abarcan el 29 y 13% de la proteína, respectivamente, que forman dos dominios estructurales, uno de ellos con un plegamiento tipo  $\alpha/\beta$ -hidrolasa que constituye el dominio catalítico, y el otro un dominio tipo tapa que cubre el sitio catalítico. A partir del modelo molecular y mediante comparación con la feruloil estearasa 3WMT, se propone a los residuos Ser-196, Asp-448, e His-494 como los residuos que constituyen la triada catalítica. Además, estos residuos de serina e histidina pudieran estar directamente conectados mediante un puente disulfuro entre las cisteínas que se encuentran contiguas a la serina e histidina, Cys-195 y Cys-495 (Figura 28 B), formando el motivo estructural descrito

recientemente (CS-D-HC) (Susuki *et al.*, 2014). El modelo molecular también mostró que uno de los sitios de reconocimiento tipo Kex2 (Lys-309-Arg-310, Figura 28 C) se encuentra en un loop flexible del dominio de tapa.

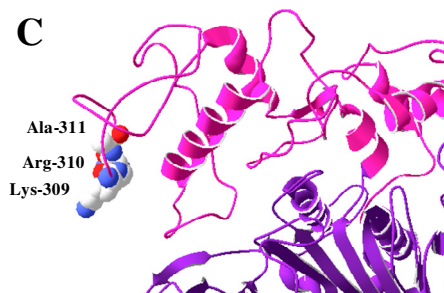
**A**



**B**



**C**

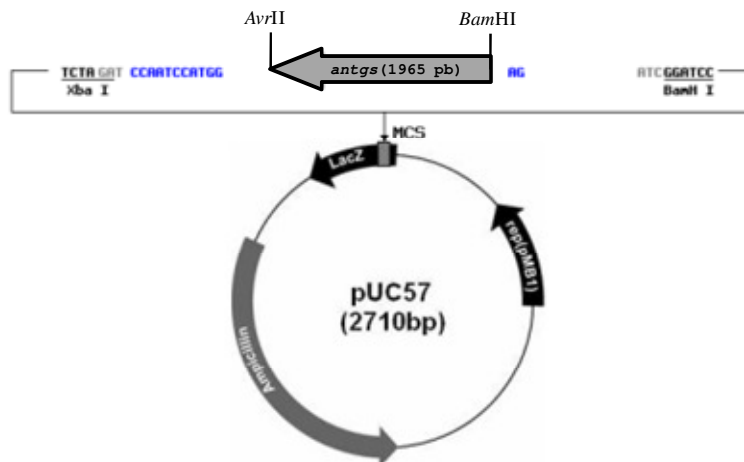


**Figura28. Modelaje molecular de la tanasa de *A. niger* GH1.** A. Modelo construido usando el servidor *Phyre*<sup>2</sup> mostrando la presencia del dominio catalítico y el dominio de tapa. B. Triada catalítica Ser-196, Asp-448, e His-494, conectada directamente por un puente disulfuro entre las cisteínas vecinas Cys-195 y Cys-495. C. Sitio de reconocimiento Kex2 (Lys-309-Arg-310) en un loop flexible del dominio de tapa.

## 7.2. Diseño y construcción de una secuencia nucleotídica *ANTgs* que codifica para la tanasa de *Aspergillus niger* GH1

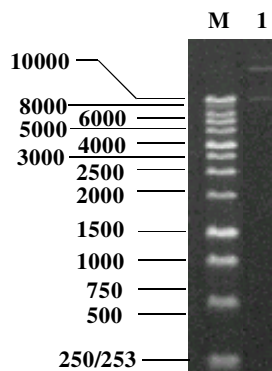
### 7.2.1. Construcción, transformación y caracterización de los vectores pUC57*ANTgs* y pGEM*ANTgs*

En la Figura 29 se muestra el vector pUC57 portando el gen *ANTgs* sintetizado, clonado y secuenciado por la compañía GenScript en el mencionado vector.



**Figura 29. Mapa del vector pUC57ANTgs.** Se muestra el gen *ANTgs* flanqueado por los sitios de restricción *Bam*HI y *Avr*II, necesarios para la posterior subclonación en el vector de expresión pPIC9.

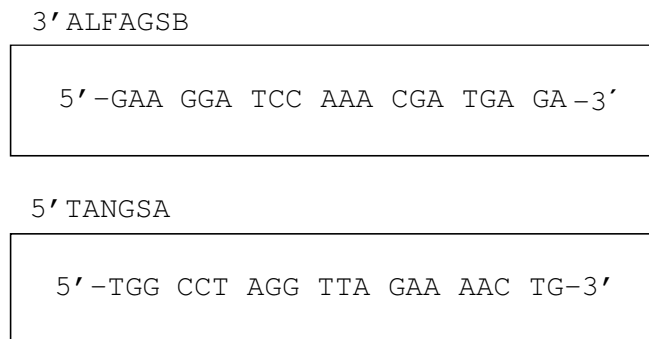
En la Figura 30 se muestra el análisis en gel de agarosa para verificar la integridad del DNA plasmídico aislado de células de *E. coli* cepa Coppy Cutter 400 transformadas con el vector pUC57ANTgs. La obtención de las bandas confirmó la integridad del DNA plasmídico aislado.



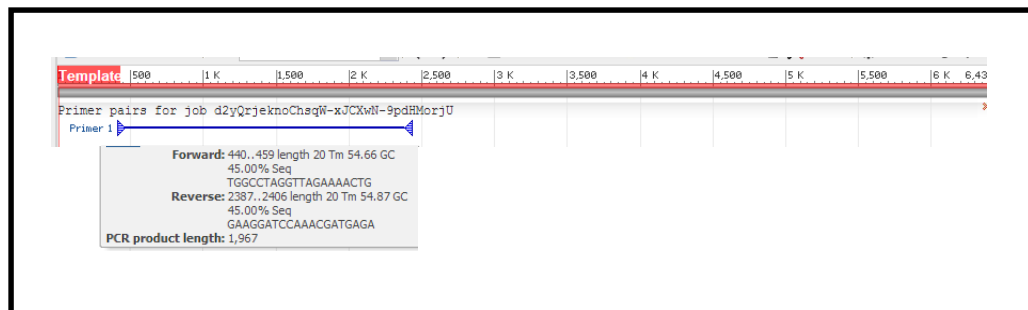
**Figura 30. Análisis en gel de agarosa para verificar la integridad del DNA plasmídico aislado de células de *E. coli* Coppy Cutter 400 transformadas con el vector pUC57ANTgs.** Carril M. 1 kb DNA Ladder (Promega). Carril 1. DNA plasmídico pUC57ANTgs.

La secuencia de los iniciadores diseñados y dirigidos al inicio y al final del gen sintético *ANTgs*, así como los diferentes elementos de éstos, se muestran en la figura 31. En la parte superior se presenta la secuencia del iniciador 3'ALFAGSB de 20 nucleótidos, en la parte inferior se muestra el iniciador 5'TANGSA de 20 nucleótidos. La verificación del diseño de estos oligonucleótidos se realizó mediante una simulación

de la PCR con la plataforma primer BLAST (Figura 32), teniendo como secuencia molde la secuencia del plásmido pUC57ANTgs. Esta simulación de la PCR con los oligonucleótidos 3'ALFAGSB y 5'TANGSA dio lugar a una única banda de 1961 pb correspondiente a la secuencia nucleotídica codificante para la secuencia prepro del factor alfa de *S. cerevisiae* y la región de la proteína madura de la tanasa de *A. niger* GH1. El programa no señaló la presencia de bandas inespecíficas.

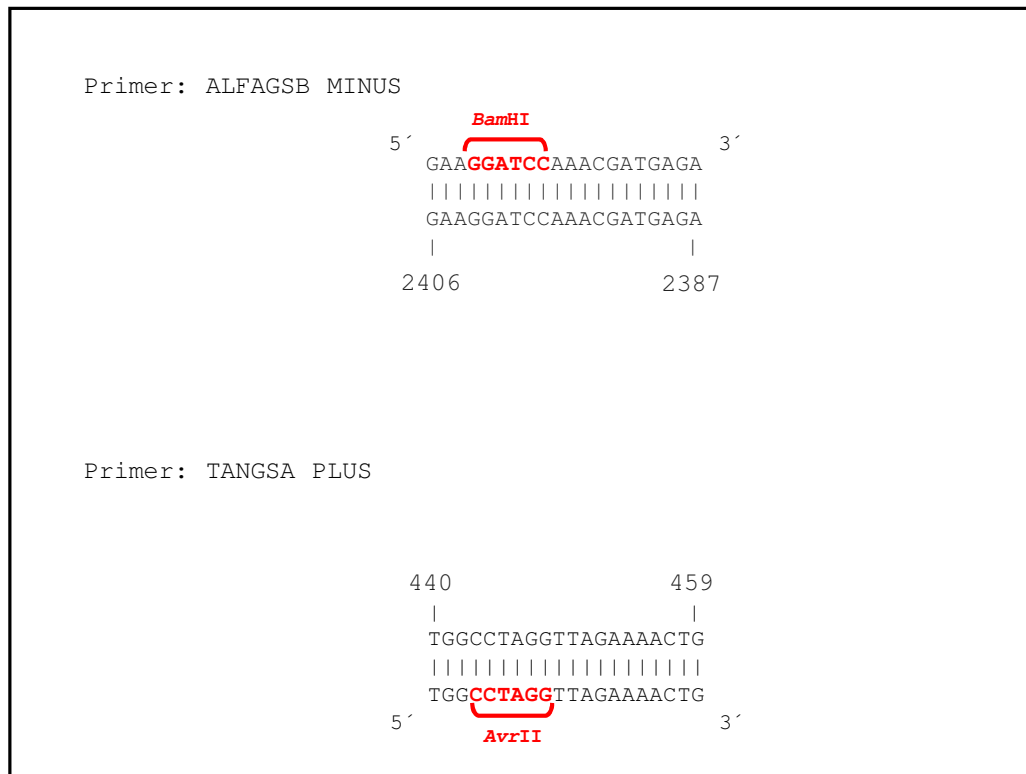


**Figura 31. Secuencia de los iniciadores 3'ALFAGSB y 5'TANGSA diseñados.**En la parte superior se muestra la secuencia del iniciador 3'ALFAGSB, en la parte inferior se muestra el iniciador 5'TANGSA.



**Figura32. Simulación de la PCR mediante la plataforma Primer BLAST.** Como datos de entrada se emplearon los iniciadores diseñados al inicio y al final del gen sintético y como secuencia molde la secuencia del plásmido pUC57ANTgs. Las flechas representan los iniciadores 3'ALFAGSB y 5'TANGSA. La línea azul representa el producto amplificado perteneciente al fragmento ANTGH1 de 1967 pb.

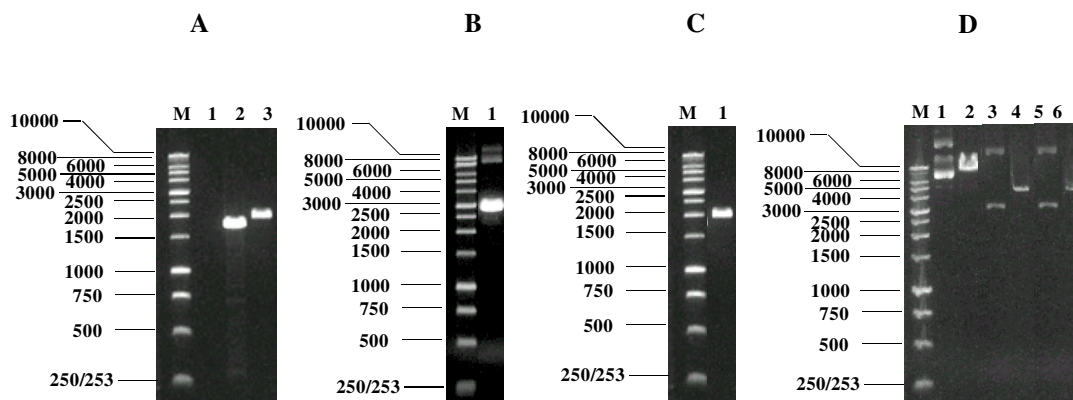
Como resultado del estudio realizado con Primer BLAST se obtuvo la Figura 33 donde se muestra la posición de los nucleótidos del iniciador 3'ALFAGSB que hibridan con la secuencia blanco (minus), y la posición de los nucleótidos del iniciador 5'TANGSA que hibridan con la secuencia blanco (plus).



**Figura 33. Identidad de los iniciadores con la secuencia molde.** El esquema de estas hibridaciones se obtuvo al realizar el análisis de los iniciadores mediante la plataforma primer BLAST.

La Figura 34 muestra cuatro geles de agarosa al 0.8% correspondientes a las etapas de síntesis del fragmento *ANTgs* mediante PCR con oligonucleótidos específicos (Sección 6.6.2) para *ANTgs* (Panel A, carril 3), transformación de pGEMANTgs (Sección 6.6.5.) en *E. coli* JM109 (Panel B, carril 1), caracterización de pGEMANTgs por PCR mediante oligonucleótidos específicos (Sección 6.6.2.) para *ANTgs* (Panel C, carril 1) y caracterización de pGEMANTgs mediante digestión (Sección 6.6.6.3, Tabla XIII) con *Bam*HI (Panel D, carril 4) y *Avr*II (Panel D, carril 6). Los resultados obtenidos confirmaron la correcta construcción del plásmido pGEMANTgs, y por lo tanto se pudo seguir con las posteriores etapas experimentales para subclonar el fragmento *ANTgs* en el vector pPIC9.

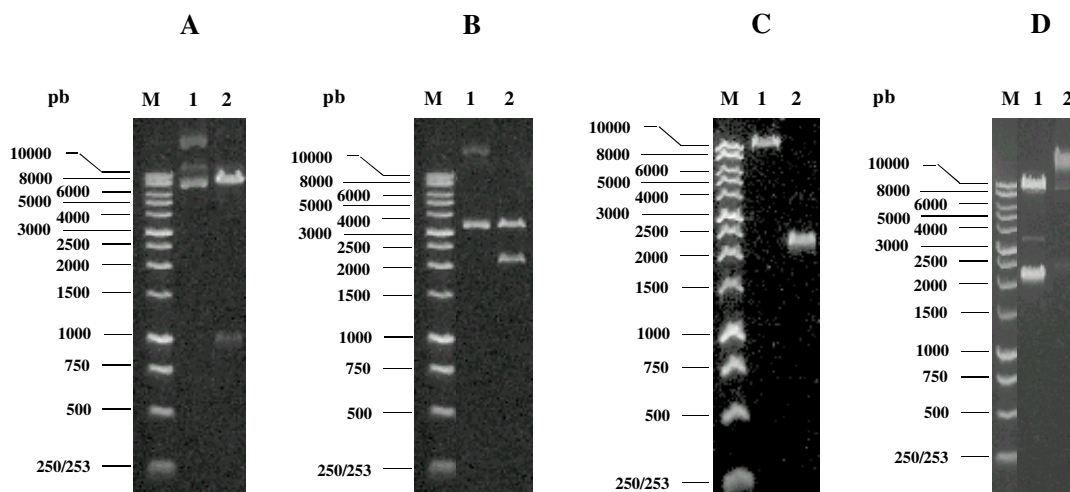




**Figura34. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de las etapas experimentales para la construcción del vector pGEMANTgs. Panel A.** Síntesis por PCR del fragmento *ANTgs* con los oligonucleótidos específicos diseñados a partir de la secuencia *ANTgs*. Carril 1: Control negativo (Sin DNA); Carril 2: Control positivo (DNAg de *A. niger* GH1 con oligos diseñados), Carril 3: DNA plasmídico de pUC57*ANTgs* donde se observa la amplificación del fragmento *ANTgs*. **Panel B.** DNA plasmídico de pGEMANTgs aislado a partir de una clona de *E. coli* JM109. **Panel C.** Caracterización mediante PCR de pGEMANTgs con oligonucleótidos específicos para el fragmento *ANTgs* (Carril 1). **Panel D.** Caracterización del vector construido pGEMANTgs. Carril 1: pPIC9*TgQ* sin digerir (Testigo negativo de corte). Carril 2: pPIC9*TgQ* digerido con *Bam*HI (testigo positivo de corte). Carriles 3 y 5: Control negativo de corte del vector construido (pGEMANTgs sin *Bam*HI o *Avr*II). Carriles 4 y 6: pGEMANTgs digerido con *Bam*HI y *Avr*II. Carriles M (paneles A, B, C y D): marcador de tamaño molecular 1 Kb DNA Ladder (Promega).

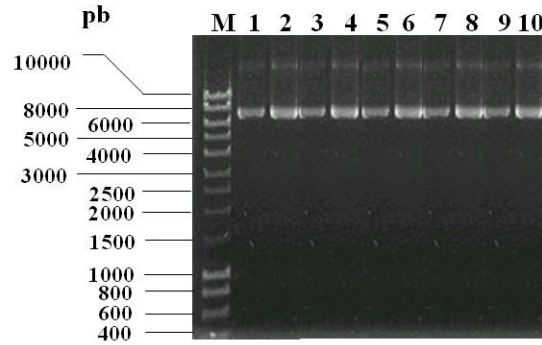
### 7.2.2. Subclonación del fragmento *ANTgs* en el vector pPIC9

La Figura 35 muestra cuatro geles de agarosa al 0.8% realizados para dar seguimiento a las etapas experimentales para subclonar el fragmento *ANTgs* en el vector pPIC9 (Tabla XV). La digestión preparativa de pPIC9*TgQ* con *Bam*HI y *Avr*II (panel A) generó dos fragmentos, uno de 7733 pb (Figura 35, panel A, carril 2), correspondiente al vector pPIC9, y otro de 1004 pb correspondiente al gen *TgQ* más la secuencia prepro. La purificación de la banda de 7733 pb (panel C, carril 1) condujo a obtener 123.5 ng de DNA que se emplearon para llevar a cabo la ligación con el fragmento *ANTgs* (panel D). La digestión preparativa de pGEMANTgs con *Bam*HI y *Avr*II (panel B) también generó dos fragmentos (Tabla XIV) de 3014 y 1955 pb (carril 1). La purificación de la banda de 1955 pb (panel C, carril 2) condujo a obtener 103.3 ng de DNA que se emplearon para llevar a cabo la ligación del fragmento *ANTgs* con el vector pPIC9 (panel D).



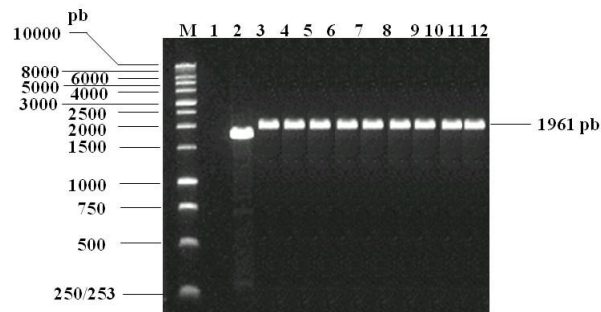
**Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de las etapas experimentales para subclonar el fragmento *ANTgs* en el vector *pPIC9*. Panel A.** digestión preparativa de *pPIC9TgQ* con *Bam*HI y *Avr*II. Carril 1: *pPIC9TgQ* sin digerir. Carril 2: *pPIC9TgQ* digerido con *Bam*HI y *Avr*II. **Panel B.** Digestión preparativa de *pGEMANTgs* con *Bam*HI y *Avr*II. Carril 1: *pGEMANTgs* digerido con *Bam*HI y *Avr*II. **Panel C.** Fragmentos purificados para llevar a cabo la ligación. Carril 1: Fragmento de 7733 pb del vector *pPIC9*. Carril 2: Fragmento de 1955 pb del fragmento *ANTgs*. **Panel D.** Ligación del vector *pPIC9* con el fragmento *ANTgs*. Carril 1: vector *pPIC9* y fragmento *ANTgs* sin DNA ligasa T4 (testigo negativo de ligación). Carril 2: vector *pPIC9* y fragmento *ANTgs* con DNA ligasa T4 después de 48 h de incubación a 4°C. Carriles M (paneles A, B, C y D): marcador de tamaño molecular 1 Kb DNA Ladder (Promega).

En el ensayo de ligación del vector *pPIC9* con el fragmento *ANTgs* (panel D, carril 2) se observó la presencia de bandas que no se encontraban en el testigo negativo de ligación (fragmentos a ligar sin ligasa, Panel D, carril 1), lo cual indicó que se llevó a cabo la ligación. Confirmada la ligación del vector *pPIC9* con el fragmento *ANTgs*, se utilizaron 2.0 µL del producto de ligación para la transformación de células de *E. coli* JM109 químicamente competentes y se obtuvieron 100 colonias transformadas, de las cuales se aislaron diez colonias, se propagaron y se extrajo el DNA plasmídico que se analizaron en gel de agarosa (Figura 36). La obtención de bandas intensas sin degradación confirmó la integridad del DNA plasmídico aislado (llamados *pPIC9ANTgs*). Además, se observaron claramente las distintas conformaciones características de los plásmidos que corresponden al DNA relajado, enrollado y superenrollado. Asimismo también se observó la ausencia de RNA.



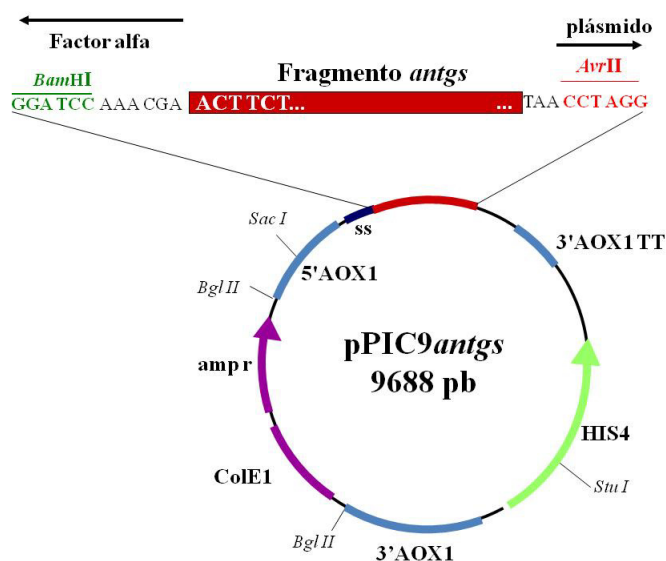
**Figura 36. Análisis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de pPIC9ANTgs.** Carril M. Marcador de tamaño molecular. Carriles 1-10. DNA plasmídico de diez colonias obtenidas durante la transformación de *E. coli* JM109 con el producto de ligación de pPIC9 y el fragmento *ANTgs*.

La caracterización de dos plásmidos pPIC9ANTgs por PCR con los iniciadores 5'ALFAGSB y 3'TANGSA que hibridan en los extremos 5' y 3' de *ANTgs*, respectivamente, se muestra en la Figura 37. La obtención de una banda de 1961 pb confirmó la presencia del fragmento *ANTgs* en el plásmido pPIC9ANTgs.



**Figura 37. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la caracterización por PCR con los iniciadores 5'ALFAGSB y 3'TANGSA del plásmido pPIC9ANTgs construido.** Carril M: Marcador de tamaño molecular (1 Kb DNA Ladder); Carril 1: Control (-) de la PCR; Carril 2: Control positivo (DNA pGEMANTGH1 con los iniciadores TanX y TanAV); Carriles 3-12: DNA plasmídico pPIC9ANTgs de diez colonias de *E. coli* transformadas. La banda de 1961 pb corresponde a la secuencia nucleotídica del fragmento *ANTgs* que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1 clonado en pPIC9.

Con estos resultados se comprobó la identidad del plásmido pPIC9ANTgs construido. En la Figura 38 se muestra un esquema del plásmido pPIC9ANTgs de 9688 pb y sus regiones más importantes: el promotor de *AOX1* (5' AOX1), la secuencia prepro del factor alfa de *S. cerevisiae*, el fragmento ANTgs, el terminador de la transcripción de *AOX1* (3' AOX1 TT), el gen de la histidinol deshidrogenasa de *P. pastoris* (HIS4), el fragmento 3' de *AOX1*, el origen de replicación ColE1 y el gen de resistencia a ampicilina (*amp<sup>r</sup>*).



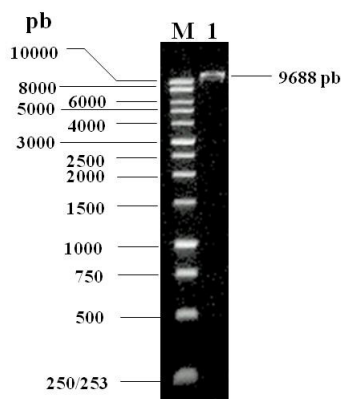
**Figura38. Representación gráfica del vector de expresión pPIC9ANTgs.**

Se indica el sitio de inserción del fragmento *Bam*HI/*Avr*II del fragmento *ANTgs* de 1961 pb en el vector pPIC9ANTgs. Se muestran también las diferentes regiones que componen el plásmido de expresión: Promotor y terminador de la transcripción del gen *AOX1* de *P. pastoris* (regiones 5' AOX1 y 3' AOX1 TT respectivamente), región 3' del mismo gen (3' AOX1), gen de la histidinol deshidrogenasa (HIS4) de *P. pastoris*, y la secuencia señal (SS). También contiene secuencias necesarias para propagación del plásmido en *E. coli* tales como el gen de resistencia a ampicilina (*amp<sup>r</sup>*) y el origen de replicación (*ColE1*). Contiene además los sitios de restricción necesarios para la integración eficiente en *P. pastoris*, que favorecen la generación de cepas Mut<sup>+</sup> His<sup>+</sup> o Mut<sup>s</sup> His<sup>+</sup> (*Sac*I, *Bgl*II, *Sal*I y *Stu*I).

### 7.3. Construcción de cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras del fragmento *ANTgs* (KM71ANT)

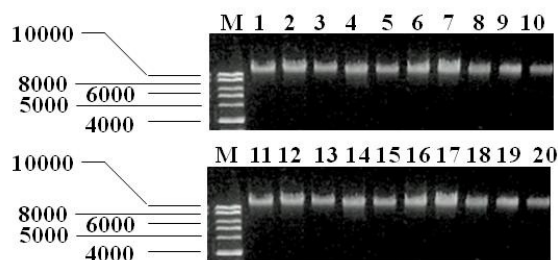
#### 7.3.1. Transformación de la cepa KM71 de *P. pastoris* con el vector de expresión construido

En la Figura 39 se muestra el análisis en gel de agarosa del vector pPIC9*ANTgs* linearizado con la enzima de restricción *SalI*, para verificar el corte total del vector. Este vector se empleó para transformar células químicamente competentes de *P. pastoris*. La obtención de una banda bien definida de 9688 pb demostró el corte total del vector.



**Figura 39. Verificación del corte total del vector de expresión pPIC9*ANTgs* con *SalI* en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X.** Carril M: marcador de tamaño molecular 1 Kb DNA Ladder (Promega). Carril 1: pPIC9*ANTgs* linearizado con la enzima *SalI*.

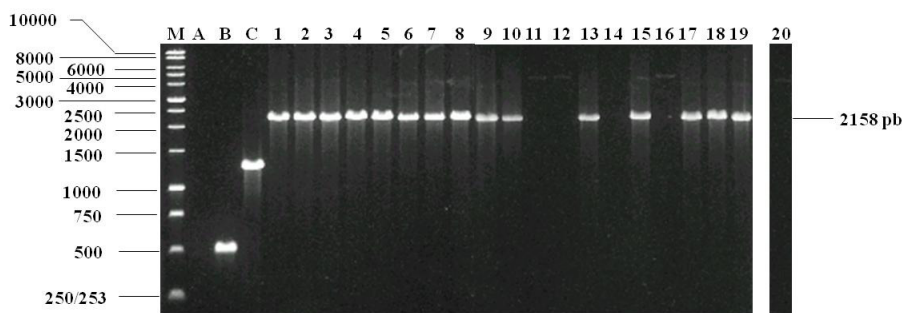
En el ensayo de transformación se obtuvieron alrededor de cien colonias transformadas con el plásmido pPIC9*ANTgs*, mientras que en el testigo negativo de transformación (sin DNA) no se obtuvieron colonias. De las cien colonias transformadas obtenidas, se seleccionaron veinte colonias al azar y se analizaron por PCR. En la Figura 40 se muestra el análisis en gel de agarosa para verificar la integridad de los DNA genómicos aislados de células de *P. pastoris* cepa KM71 transformadas con el vector pPIC9*ANTgs* linearizado previamente con *SalI*. La obtención de bandas intensas y definidas demostró la integridad de todos los DNA genómicos aislados. Con estos DNA genómicos obtenidos se procedió a realizar el análisis por PCR del genotipo de las cepas KM71ANT His<sup>+</sup> obtenidas.



**Figura 40.** Verificación de la integridad del DNA genómico aislado de cepas de *P. pastoris* KM71 transformadas con el vector pPIC9ANTgs (gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X). Carril M: marcador de tamaño molecular DNA Ladder (Promega). Carriles 1-20: DNA genómico aislado de cepas KM71 transformadas con el vector pPIC9ANTgs linearizado con *Sall*.

### 7.3.2. Análisis por PCR del genotipo de las cepas recombinantes obtenidas

El análisis mediante PCR con los oligonucleótidos 5'AOXy 3'AOX del DNA genómico aislado de 20 cepas recombinantes de *P. pastoris* KM71ANT (transformantes His<sup>+</sup>) mostró una banda de 2158 pb (carriles 1-10, 13, 15, 17-19, Figura 41) que corresponde a la secuencia prepro del factor alfa (255 pb), a la secuencia del gen sintético que codifica para la tanasa de *A. niger* GH1 (1689 pb) y los fragmentos del sitio múltiple de clonación del vector pPIC9 (21 pb), promotor de *AOX1* (94 pb) y terminador de la transcripción (99 pb). Este resultado indicó la ausencia del gen estructural *AOX1* y la correcta integración del casete de expresión en el genoma de *P. pastoris*, por lo tanto confirmó los genotipos *aox1* y Ant. En los carriles B y C se obtuvo una banda de 493 pb y 1212 pb, respectivamente, correspondiente al testigo positivo de AOX (carril B) y al testigo positivo de integración (carril C, DNA genómico de KM71TgQ).



**Figura 41.** Análisis de PCR del DNA genómico aislado de las colonias de cepas KM71ANT. Carril M: marcador de tamaño molecular DNA Ladder (Promega). Carril (A): control negativo de PCR (sin DNA). Carril (B): control positivo de integridad (DNA genómico de KM71pPIC9). Carril (C) Control positivo de PCR (DNA genómico de KM71pPIC9TgQ). Carriles 1-20: DNA genómico de las colonias transformantes His<sup>+</sup> de *P. pastoris*KM71ANT mostrando la banda esperada de 2158 (sólo carriles 1-10, 13, 15 y 17-19).

Este análisis por PCR mostró que el 75% (15) de las colonias recombinantes resultaron ser positivas para el análisis de la integración del casete de expresión en el genoma de *P. pastoris*. Los carriles 11, 12, 14, 16 y 20 (Figura 41) no mostraron amplificación con los iniciadores específicos de *AOX*, lo que indica que estas 5 cepas no integraron el plásmido en su genoma. Así mismo, la ausencia de una banda de 2105 pb correspondiente al gen *AOX1* confirmó el genotipo *aox1* de las cepas construidas.

### 7.3.3. Cultivo bajo condiciones de inducción del gen heterólogo de la cepa KM71ANT: Fenotipo ANT<sup>+</sup>

En el cultivo bajo condiciones de inducción del gen heterólogo de una cepa KM71ANT, los valores de proteínas totales (μg/mL) después de 48 h de inducción, DO<sub>600</sub>, pH y actividad enzimática de tanasa (U/mL) fueron de 38.4, 46.71, 1.9, y 0.57, respectivamente. Estos resultados corroboraron la capacidad de la cepa KM71ANT de producir y secretar la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante y por lo tanto su fenotipo ANT<sup>+</sup>.

## 7.4. Caracterización bioquímica de la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante

### 7.4.1. Semipurificación de la tanasa recombinante por ultrafiltración

En la tabla XXIX se muestran los resultados de la evaluación del proceso de obtención por ultrafiltración de un concentrado enzimático de tanasa recombinante.

**Tabla XXIX.** Evaluación del proceso de obtención de un concentrado enzimático de tanasa recombinante.

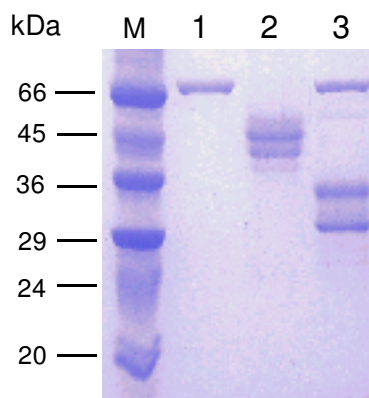
	Concentración de proteínas totales (mg/L)	Volumen (mL)	AVT (U/mL)	Factor de concentración	Recuperación de proteínas (%)	Recuperación de tanasa (%)
<b>MCLC</b>	46.71	50	0.57	---	100	100
<b>Concentrado</b>	1604.2	1	27.5	48	68.7	96.5

AVT: Actividad volumétrica de tanasa

MCLC: Medio de cultivo libre de células

#### 7.4.2. Determinación de la masa molecular aparente de la tanasa recombinante, predicción y evaluación experimental de la N-glicosilación y posible forma bicatenaria

En la Figura 42 se muestra el análisis en un gel de SDS-PAGE al 12% del concentrado enzimático obtenido por ultrafiltración tratado y sin tratar con la glicosidasa endo H<sub>f</sub> para determinar su masa molecular, y la posible N-glicosilación y forma bicatenaria. La tanasa recombinante sin tratamiento con la enzima endo H<sub>f</sub> mostró dos bandas anchas de masas moleculares aparentes de 45.0-54.8 y 41.8-45.0 kDa, con una intensidad mayor en las masas moleculares de 48.7 y 42.4 kDa (Figura 42, carril 2). Después del tratamiento de N-desglicosilación con endo H<sub>f</sub>, las dos bandas cambiaron a masas moleculares aparentes de 34.6y 30.3 kDa, respectivamente (Figura 42, carril 3).



**Figura 42.** Análisis por SDS-PAGE al 12% concentrado enzimático obtenido por ultrafiltración tratado y sin tratar con la glicosidasa endo H<sub>f</sub>. Carril M: Marcador de peso molecular. Carril 1: endo H<sub>f</sub>. Carril 2: concentrado enzimático sin tratamiento con endo H<sub>f</sub>. Carril 3: concentrado enzimático con tratamiento con endo H<sub>f</sub>.

Estos resultados indican claramente que la tanasa está altamente N-glicosilada y que posee dos cadenas polipeptídicas. Además, en la Figura 43 se muestra el análisis de la secuencia aminoacídica de la tanasa recombinante con el programa NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) para predecir los sitios de N-glicosilación. El programa detectó 11 sitios potenciales de N-glicosilación: 19NGTL, 54NVTV, 130NGSI, 237NATI, 265NLTS, 280NYTS, 304NGSV, 383NVTY, 451NTTY, 508NATV y 535NSSF.



Nombre: Tanasa de *A. niger* GH1 Número de aa: 562

```

TSLSDLCTVSNVQSALPSNGTLLGINLIPSAVTANTVTDASSGMGSSGSYDYCNVTVTYHTGKGDKVVVKYALPAPSDF      80
KNRFYVAGGGGSLSSDATGGLEYGAASGATDAGYDAFSYSYDEVVLYNGSINWDATYMFYSYQALGEMTKIAKPLTRGF      160
YGLSSDKKIYTYEGCSDGGREGMSQVQRWGDEYDGVIAGAPAFRFAQQQVHHVFPATIEHTMDYYPPPCELDKIVNATI      240
EACDPLDGRDGVVSRDLCMLNFNLTSIIIGESYYCAEQNTSLGFGFSKRAEGSTTSYQPAQNGSVTAEGVALAQAIYD      320
GLHDSNGKRAYLSWQIAAELSDGDTEYDSTDSWTLSIPSTGGEYVTKFVQLLNIDNLENLDNVTYDTLVDDMNIGMIRY      400
IDSLQTTVIDLTTFKESGGKMIHYHGSDPSIPTASSVHYWQSVRQAMYPNTTYTQSLQDMSNWWYQLYLVPGAHCCTNS      480
LQPGPYPEDNMEIMIDWVENGNKPSRLNATVSSGTYAGETQMLCQWPSPRLWNSNSSFSCVHDSKSLATWDYTFDAFKMP      560
VF
.....N.....N.....      80
.....N.....N.....      160
.....N.....N.....N.....      240
.....N.....N.....N.....      320
.....N.....N.....      400
.....N.....      480
.....N.....      560
.....N.....      640

```

Figura 43. Predicción de los sitios potenciales de N-glicosilación de la secuencia aminoacídica de la tanasa de *A. niger* GH1 con el programa NetNGlyc 1.0.

### 7.4.3. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la tanasa recombinante

En la Figura 44 se muestra el efecto del pH sobre la actividad enzimática de la tanasa recombinante. La tanasa recombinante mostró una actividad enzimática mayor del 40% de su máxima actividad en un intervalo de pH de 4.0-7.0, y más de un 80% de su máxima actividad en un intervalo de pH entre 4.0 y 5.0. El pH óptimo de la tanasa producida fue de 5.0 (Figura 44). Los valores de pH donde se observaron los menores porcentajes de actividad relativa fueron 2.5 y 9.0, ambos con porcentajes menores al 20% de su máxima actividad.

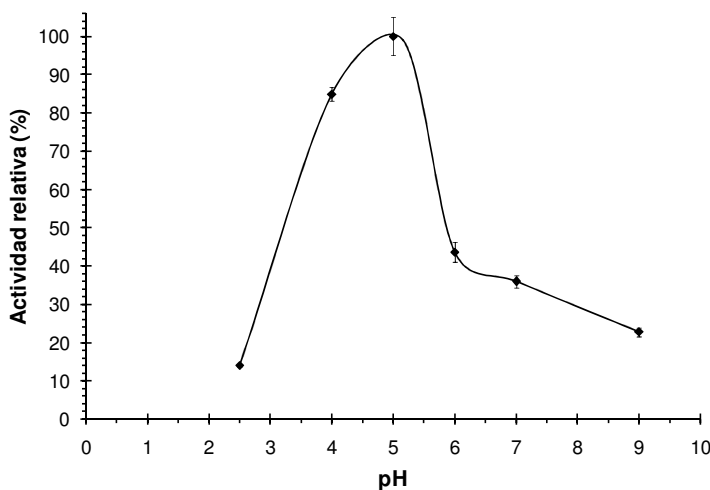
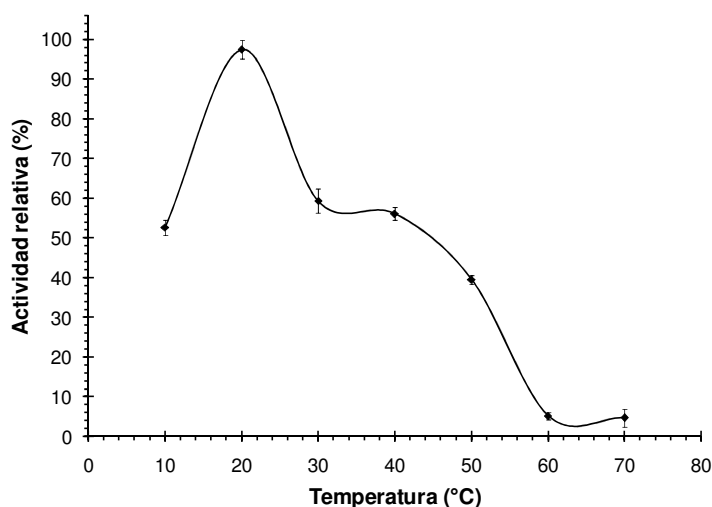


Figura 44. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la tanasa recombinante a 30°C. Los puntos representan la media de tres ensayos enzimáticos independientes.

#### 7.4.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la tanasa recombinante

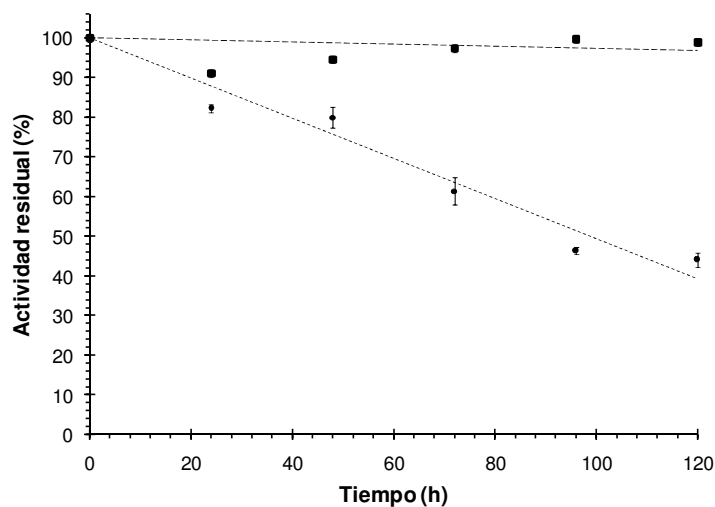
En la Figura 45 se muestra el resultado del efecto de diferentes temperaturas (10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70°C) en la actividad enzimática de la tanasa recombinante. La tanasa recombinante mostró actividad en un amplio intervalo de temperaturas (10-50°C). El intervalo de temperaturas donde presentó valores mayores al 50% de su máxima actividad fue de 10-40°C y su temperatura óptima fue de 20°C. Los valores de temperatura donde se presentaron porcentajes menores al 20% de su máxima actividad fueron 60 y 70°C.



**Figura 45. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la tanasa recombinante a pH 5.0.** Los puntos representan la media de tres ensayos enzimáticos independientes.

#### 7.4.5. Estabilidad de la tanasa recombinante

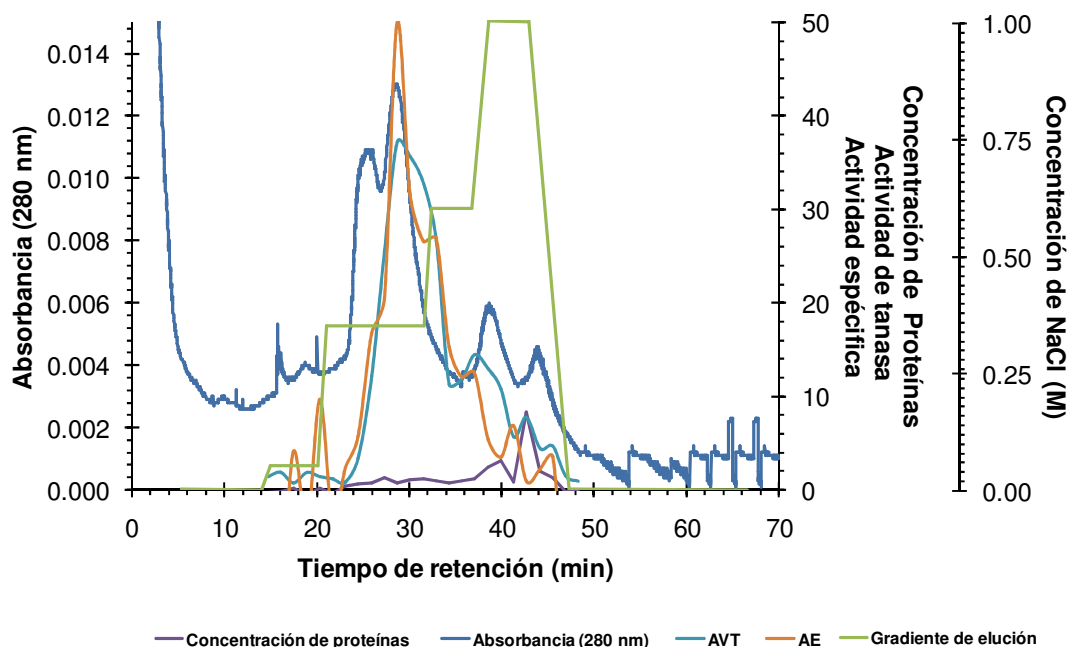
En la Figura 46 se muestra la actividad residual de la tanasa recombinante después de incubar el concentrado enzimático a 30 y 4°C a pH 5.0. La actividad residual en los ensayos de estabilidad siguieron cinéticas de orden cero con una velocidad de reacción de 0.01 y 0.48%/h a 4 y 30°C, respectivamente, disminuyendo a 98.9 y 44.0% después de 120 h.



**Figura 46. Actividad residual de la tanasa recombinante a 30 (●) y 4°C (■).** Los puntos representan la media de tres determinaciones de tres ensayos independientes.

#### 7.4.6. Determinación de la actividad específica de la tanasa recombinante

En la Figura 47 se muestra el cromatograma de intercambio aniónico del concentrado de la tanasa recombinante. Este cromatograma mostró dos picos predominantes mediante detección por UV a 280 nm. Uno de los picos que eluyó a una concentración de NaCl de 0.35 M mostró actividad de tanasa. En el máximo de este pico, los valores de la concentración de proteínas totales (mg/L) y actividad volumétrica de tanasa (U/L) fueron de 0.74 y 37.2, respectivamente, por lo que la actividad específica (20°C, pH 5.0) en el máximo de este pico fue de 50 U/mg de proteína.



**Figura 47. Cromatograma de intercambio aniónico del concentrado enzimático de tanasa recombinante.** AVT:Actividad volumétrica de tanasa. AE:Actividad específica.

#### 7.4.7. Constantes cinéticas de la tanasa recombinante

La tanasa recombinante siguió una cinética típica de Michaelis-Menten a 20 y 30°C ( $r^2 = 0.947$  y  $0.978$ , respectivamente). Las constantes de Michaelis ( $K_m$ ) y la velocidad máxima de reacción ( $V_{max}$ ) fueron estimadas en valores de  $1.98 \pm 0.50$  mM y  $2.01 \pm 0.14$   $\mu\text{mol/min}$ , y  $0.18 \pm 0.04$  mM y  $0.48 \pm 0.02$   $\mu\text{mol/min}$  a 20 y 30°C, respectivamente.

## 8. DISCUSIÓN

Recientemente, el hongo xerófilo *A. niger* GH1 ha sido descrito como un productor de tanasa tanto en cultivo sumergido como en cultivo en soporte sólido (Cruz-Hernández *et al.*, 2005, Cruz-Hernández *et al.*, 2006, Cruz-Hernández *et al.*, 2009). Las propiedades bioquímicas de la tanasa nativa de *A. niger* GH1 también han sido descritas (Mata-Gómez *et al.*, 2009) y estas propiedades han sido comparadas con la tanasa de *A. niger* GH1 producida en cultivos en soporte sólido y cultivos sumergidos (Renovato *et al.*, 2011). En el presente trabajo se reportan las secuencias nucleotídica y aminoacídica de la tanasa madura de *A. niger* GH1. Además, se utilizó el sistema de expresión de *P. pastoris* para producir la enzima, utilizando un gen sintético, y se caracterizó la tanasa recombinante producida.

Para secuenciar el gen de tanasa de *A. niger* GH1 se requería de DNA genómico de este hongo. Sin embargo, fue difícil obtener el DNA genómico empleando el procedimiento habitual de nuestro laboratorio (lisis con TSNT). Esta dificultad fue inicialmente atribuida a que con el procedimiento de TSNT se obtenía una banda en el gel de agarosa que parecía RNA degradado y no el DNA genómico necesario para llevar a cabo la amplificación por PCR. Por lo tanto, fue necesario el empleo de otra técnica diferente a la lisis con TSNT para obtener el DNA genómico de *A. niger* GH1. Específicamente en el Departamento de Investigación en Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila emplearon una lisis mecánica del micelio mediante maceración en mortero de una muestra congelada en nitrógeno líquido. Posteriormente la extracción del DNA genómico se realizó mediante extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

Las secuencias nucleotídica y aminoacídica de la tanasa de *A. niger* GH1 resultaron ser similares pero no idénticas a la tanasa de *A. kawachii* IFO 4308. Debido a que no hay una estructura tridimensional reportada de una proteína con una alta

identidad en su secuencia con la tanasa de *A. niger* GH1 que se encuentre disponible en el Protein Data Bank, no es adecuado realizar la construcción de un modelo molecular por comparación con homólogos (Zhang *et al.*, 2002). Sin embargo, el reconocimiento del plegamiento de proteínas por el método *threading* puede modelar secuencias de proteínas con menos del 20% de identidad en la secuencia con respecto a una proteína conocida. El servidor Phyre<sup>2</sup> utiliza el método *threading* para el modelaje molecular de proteínas y se encuentra entre los mejores servidores según el “CriticalAssessment of ProteinStructurePrediction” (CASP) (Kelley *et al.*, 2009). Por lo tanto, en el presente trabajo se utilizó el servidor Phyre<sup>2</sup> para construir un modelo molecular de la tanasa de *A. niger* GH1, y se encontró que la tanasa tiene un plegamiento similar a la estructura tridimensional de una feruloilesterasa de *A. oryzae* cuyo código PDB es 3WMT (dos dominios estructurales: un dominio  $\alpha/\beta$ -hidrolasa y un dominio de tapa), la cual tiene una identidad en la secuencia aminoacídica del 24% respecto a la tanasa de *A. niger* GH1. Adicionalmente, ambas estructuras tienen una triada catalítica que forma el dominio estructural CS-D-HC. El presente trabajo es el primer reporte de una estructura molecular propuesta de una tanasa de la familia de las Tanasas PF07519 con un plegamiento muy similar a una feruloilesterasa, que tiene dos dominios estructurales y el motivo CS-D-HC. Sin embargo, la especificidad de las dos enzimas hacia su sustrato es diferente, probablemente porque el sitio de unión al sustrato está formado por diferentes residuos de aminoácidos en las dos enzimas: Phe-225, Gln-228, Gln-229, Glu-365, Ser-279, Gly-381, e Ile-451 para la tanasa de *A. niger* GH1, y Phe-232, Leu-235, Thr-236, Tyr-348, Phe-354, Tyr-356, e Ile-419 para la feruloilesterasa de *A. oryzae* (Suzuki *et al.*, 2014).

Para llevar a cabo la subclonación del fragmento *ANTgs* del plásmido pUC57*ANTgs* al plásmido pPIC9*ANTgs* fue necesario realizar una etapa adicional no contemplada inicialmente, la cual consistió en realizar una subclonación del fragmento *ANTgs* del plásmido pUC57*ANTgs* al plásmido pGEM*ANTgs* para posteriormente realizar otra subclonación en el vector de expresión pPIC9 de *P. pastoris*. Esta etapa adicional fue realizada debido a que el DNA plasmídico obtenido de un cultivo de las células de *E. coli* EPI400 transformadas con pUC57*ANTgs* que fueron proporcionadas por la empresa GenScript, generó mediante análisis por restricción con las enzimas *Bam*HI y *Avr*II,

cortes necesarios para llevar a cabo la subclonación en pPIC9, patrones de bandas en geles de agarosa diferentes a los esperados teóricamente. El análisis de restricción con la enzima *XhoI* confirmó la presencia de DNA extraño. Sin embargo, los cortes con las enzimas *BamHI* y *AvrII* del plásmido pGEMANTgs (Figura 35) siempre mostraron patrones de bandas en geles de agarosa esperados.

En el presente trabajo se construyeron cepas recombinantes de *P. pastoris* para producir la tanasa de *A. niger* GH1 como un polipéptido extracelular maduro de 562 aminoácidos, ya que se removió de la construcción recombinante la probable secuencia señal nativa (19 residuos) calculada mediante predicción con el servidor SignalP 4.1 (Petersen *et al.*, 2011) para la tanasa de *A. niger* CBS513.88. Además, el polipéptido maduro fue fusionado en marco de lectura con el péptido prepro del factor alfa de *S. cerevisiae*, el cual es conocido por ser una buena señal de secreción para *P. pastoris* (Sreekrishna *et al.*, 2010).

Actualmente ha sido reportada la producción de siete tanasas en microorganismos, *Lactobacillus plantarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, y *A. niger* (Kannan *et al.*, 2011; Beniwal *et al.*, 2010; Sivashanmugam *et al.*, 2013; Mondal *et al.*, 2000; Darah *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2004). Entre estas tanasas, seis fueron tanasas nativas y sólo una de *A. oryzae* fue producida como recombinante (Yu *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2004). De entre las tanasas nativas, cinco han sido producidas en cultivo sumergido convencional y sólo la tanasa de *A. niger* GH1 fue producida de manera extracelular en cultivo en estado sólido, siendo el nivel de producción más alto (2291 U/L en 20 h) comparada a las otras tanasas nativas. Sin embargo, en el caso de la tanasa de *A. niger* GH1 se observó una disminución en la actividad de tanasa después de 20 h de incubación, la cual estuvo asociada con un concomitante incremento de actividad de proteasas (Cruz-Hernández *et al.*, 2005).

La tanasa de *A. oryzae* ha sido producida en el sistema de expresión de *P. pastoris* de manera extracelular (Zhong *et al.*, 2004) e intracelular (Yu *et al.*, 2008), resultando una actividad de 7 U/mL después de 96 h de inducción en un cultivo en lote alimentado empleando un biorreactor de 3 L en el primer caso, y 0.96 U/mL después de 72 h de inducción en un cultivo a nivel matraz para el segundo caso, ambos realizados

con una cepa Mut<sup>s</sup>. Sin embargo, en ningún caso se usaron genes sintéticos basados en el uso de codones preferenciales de *P. pastoris* y optimizado el contenido de AT para el gen de la tanasa y/o la secuencia codificante del péptido prepro del factor alfa de *S. cerevisiae*, ni se describieron las propiedades bioquímicas de las tanasas recombinantes, excepto por la formación de una estructura de doble cadena. Debido a que altas densidades celulares en *P. pastoris* pueden ser alcanzadas en un simple biorreactor en una forma controlada, se puede esperar un incremento de 10 a 100 veces en la producción de la tanasa de *A. niger* GH1 producida a nivel matraz, tal como se ha descrito para otras proteínas producidas en *P. pastoris* (Viader-Salvadó *et al.*, 2013).

En trabajos realizados con *P. pastoris* se ha sugerido el uso de temperaturas menores a 30°C durante la etapa de inducción para la producción de proteínas heterólogas en el medio de cultivo (Jahic *et al.*, 2003; Viader-Salvadó *et al.*, 2013). Sin embargo, en el presente trabajo al realizar cultivos de cepas de *P. pastoris* KM71ANT productoras de tanasa a 20°C en matraces y medio BMM, no se detectó actividad enzimática de tanasa en el medio de cultivo libre de células, mientras que a 30°C sí se detectó la actividad de tanasa. La temperatura en la etapa de inducción jugó un papel importante, ya que a partir del cultivo a 30°C se pudo obtener un concentrado enzimático que permitió realizar la caracterización bioquímica de la tanasa recombinante producida. Por otro lado, en el presente trabajo también se quiso seleccionar una cepa sobreproductora de la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante a partir de colonias obtenidas por un subcultivo en placa de las colonias obtenidas en la transformación de *P. pastoris* KM71. Para esto se realizaron microcultivos en dos etapas (medios BMG y BMM) y se evaluó la concentración de proteínas en el medio de cultivo libre de células después de 24 h de inducción. Mediante este procedimiento, se seleccionaron cuatro cepas sobreproductoras. Sin embargo los cultivos en matraz en condiciones de inducción de estas cuatro cepas mostraron la secreción de proteínas, pero no se detectó actividad enzimática de tanasa en el medio de cultivo libre de células. El análisis por SDS-PAGE de las proteínas extracelulares tratadas y sin tratar con endo H<sub>f</sub> mostró tres bandas, dos de ellas a una masa molecular esperada (entre 30-35 kDa) y otra con una masa molecular de 10 kDa, por lo que se pensó en una posible degradación de la tanasa que impedía la detección de la actividad enzimática de tanasa. Por lo tanto, fue necesario emplear una



de las cepas originales de la placa en medio RBD sin histidina del ensayo de transformación para poder producir la tanasa recombinante y realizar su caracterización bioquímica.

El servidor NetNGlyC 1.0 calculó once sitios potenciales de N-glicosilación para la tanasa de *A. niger* GH1. De entre estos sitios potenciales de N-glicosilación, tres (130NGSI, 265NLTS y 451NTTY) son más probables a ser N-glicosilados, ya que el modelo molecular de la tanasa de *A. niger* GH1 mostró que estos tres sitios están en la superficie de la proteína. Sin embargo, son necesarios datos experimentales para verificar si una proteína recombinante es N-glicosilada por el hospedero, ya que la presencia de sitios de N-glicosilación no es suficiente para concluir que un residuo de asparagina podría resultar N-glicosilado. Los resultados del tratamiento con la glicosidasa endo H<sub>f</sub> claramente demuestran que la tanasa recombinante fue N-glicosilada, ya que no se observó una banda en los geles de SDS-PAGE correspondiente a la masa molecular teórica de la tanasa madura de *A. niger* GH1 (61.4 kDa), en base a la secuencia aminoacídica deducida a partir del gen de la tanasa. Sin embargo, se observaron principalmente dos bandas anchas (Figura 42, carril 2) en masas moleculares menores (48.7 y 42.4 kDa) que la masa molecular teórica esperada para la tanasa madura de *A. niger* GH1, que se movieron a dos bandas definidas a masas moleculares de 34.6 y 30.3 kDa (Figura 42, carril 3) después de la N-desglicosilación mediante la glicosidasa endo H<sub>f</sub>. El patrón de N-glicosilación de la tanasa recombinante deberían ser similar al descrito para otras proteínas recombinantes producidas en *P. pastoris* (Daly *et al.*, 2005; Macauley-Patrick *et al.*, 2005; Montesino *et al.*, 1998). Estos resultados también indican que el concentrado enzimático de tanasa recombinante tuvo un alto grado de pureza. Además, la tanasa recombinante consistió de dos subunidades, probablemente unidas mediante un puente disulfuro, generadas por un corte con la proteasa Kex2 del producto del gen de tanasa, ya que la secuencia de la tanasa madura de *A. niger* GH1 tiene dos pares de aminoácidos básicos (Lys-309-Arg-310, y Lys-347-Arg-348) que son un sitio típico de reconocimiento de la proteasa Kex2. Este tipo de estructura ha sido descrita para la tanasa nativa de *A. oryzae* (Hatamoto *et al.*, 1996), y una tanasa de *A. oryzae* recombinante ya sea producida de forma extracelular (Zhong *et al.*, 2004) o intracelular (Yu *et al.*, 2008) en *P. pastoris*. De los dos sitios de

reconocimiento Kex2, el sitio Lys-309-Arg-310 es más probable que sea reconocido por la proteasa Kex2, ya que el modelo molecular mostró que este sitio se encuentra en la superficie de la proteína en un loop flexible del dominio de tapa (Figura 28 C). En contraste, el sitio Lys-347-Arg-348 está localizado en una hélice alfa del lado inferior del dominio de tapa y no está tan expuesto a la superficie de la proteína como el sitio Lys-309-Arg-310. Un corte por la proteasa Kex2 a un lado de Arg-310 generaría dos péptidos de 31.2 y 30.2 kDa. El puente disulfuro entre la Cys-195 y la Cys-495 uniría ambos péptidos.

Todas las propiedades bioquímicas de la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante fueron determinadas usando el concentrado enzimático preparado por ultrafiltración del medio de cultivo libre de células. Además, se realizó un intercambio de buffer durante el proceso de ultrafiltración para remover péptidos de bajo peso molecular y otros componentes que podrían afectar las propiedades bioquímicas. Adicionalmente, los análisis por medio de SDS-PAGE del concentrado de la tanasa por ultrafiltración mostraron que la preparación tuvo un alto grado de pureza de proteínas (Figura 42). Todas las propiedades bioquímicas descritas en este trabajo son valores relativos, ya sea al valor máximo o al valor inicial (Figuras 44, 45 y 46). Por lo tanto, si algunas impurezas residuales pudieran afectar las propiedades bioquímicas de la preparación del concentrado de la tanasa, éstas no afectarían a los valores relativos de las propiedades bioquímicas.

Las tanasas de *A. niger* GH1 nativa y recombinante tienen la misma secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, cualquier diferencia en sus propiedades bioquímicas (efecto del pH y temperatura en la actividad enzimática, y estabilidad) podría ser debido a sus diferentes grados de N-glicosilación y/o a sus diferentes estructuras, ya que la tanasa nativa de *A. niger* GH1 es principalmente una cadena glicopolipeptídica simple de 102-105 kDa (Renovato *et al.*, 2011) y la tanasa recombinante es una proteína de doble cadena hiperglicosilada. La N-glicosilación afecta las propiedades bioquímicas como la masa molecular y el pH óptimo (Guo *et al.*, 2008). Mientras que la tanasa nativa de *A. niger* GH1 mostró un pH óptimo de 6.0-7.0 y una temperatura óptima de 60°C (Renovato *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2011), la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante mostró un pH óptimo de 5.0 y una temperatura óptima de 20°C. La tanasa recombinante

producida en el presente trabajo es la primera tanasa descrita del género *Aspergillus* con una temperatura óptima de 20°C. Además, la tanasa de *A. niger* GH1 recombinante tuvo mayor actividad relativa en comparación con la tanasa nativa de *A. niger* GH1 en un intervalo de temperaturas de 10 a 40°C, lo cual podría ser una ventaja para muchas aplicaciones en alimentos y bebidas (Chávez-González *et al.*, 2012). Las tanasas nativa y recombinante mostraron alta actividad residual a 4°C por al menos 120 h. Es de remarcar que las propiedades bioquímicas de una tanasa de *Aspergillus* con estructura de doble cadena no han sido descritas hasta hace poco (Mizuno *et al.* 2014). Sin embargo, en ese trabajo las propiedades bioquímicas de la tanasa nativa y recombinante fueron muy similares, probablemente porque ambas tuvieron una estructura de doble cadena, lo cual no es nuestro caso.

Basados en sus perfiles de actividad a diferentes valores de pH y temperatura, la tanasa producida en este estudio podría ser utilizada en el procesado de alimentos y bebidas a bajas temperaturas.

## 9. CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo se reportan las secuencias nucleotídica y aminoacídica de la tanasa madura de *A. niger* GH1.
2. La estructura molecular de la tanasade *A. niger* GH1 tiene un plegamiento similar a la estructura de la feruloilesterasa de *A. oryzae* (código PDB 3WMT) con dos dominios estructurales: un dominio  $\alpha/\beta$ -hidrolasa y un dominio de tapa.
3. La triada catalítica de la tanasa de *A. niger* GH1 probablemente está constituida por los aminoácidos Ser-196, Asp-448, y His-494, los cuales están unidos mediante un puente disulfuro entre las cisteínas 195 y 495, formando el motivo estructural CS-D-HC.
4. El sitio de unión al sustrato de la tanasa de *A. niger* GH1 está formado por los residuos de aminoácidos Phe-225, Gln-228, Gln-229, Glu-365, Ser-279, Gly-381 e Ile-451.
5. La levadura *P. pastoris* es capaz de producir y secretar al medio de cultivo la tanasa de *A. niger* GH1 como una proteína N-glicosilada y funcionalmente activa, constituida por dos subunidades polipeptídicas unidas por un puente disulfuro.
6. Tres de los once sitios potenciales de N-glicosilación (130NGSI, 265NLTS, y 451NTTY) son los más probables a ser N-glicosilados debido a que estos sitios se encuentran en la superficie de la proteína.
7. La secuencia de la tanasa de *A. niger* GH1 tiene dos pares de aminoácidos básicos (Lys-309-Arg-310, y Lys-347-Arg-348) que son sitios de reconocimiento de la proteasa Kex2, siendo el sitio Lys-309-Arg-310 el más probable que sea reconocido por Kex2, ya que este sitio está ubicado en la superficie de la proteína.
8. La tanasa recombinante mostró propiedades bioquímicas diferentes que la tanasa nativa de *A. niger* GH1 (diferente glicosilación, presencia de dos subunidades, diferentes perfiles de actividad a diferentes valores de pH y temperatura, y diferente estabilidad a 30°C).

9. La tanasa recombinante mostró un pH óptimo de actividad de 5.0 y una temperatura óptima de actividad de 20°C, siendo la primera la primera tanasa del género *Aspergillus* descrita con una temperatura óptima de 20°C.
10. La tanasa recombinante tuvo mayor actividad relativa en comparación con la tanasa nativa de *A. niger* GH1 en un intervalo de temperaturas de 10 a 40°C, lo cual podría ser una ventaja para muchas aplicaciones en alimentos y bebidas.
11. Basados en sus perfiles de actividad a diferentes valores de pH y temperatura, la tanasa recombinante producida en este trabajo podría ser utilizada en el procesamiento de alimentos y bebidas a bajas temperaturas.

## 10. PERSPECTIVAS

Los niveles de producción de la tanasa recombinante en *P. pastoris* obtenidos en el presente trabajo aumentarían realizando cultivos en biorreactores, ya que en un biorreactor es posible mantener la temperatura y pH constantes, a diferencia del cultivo a nivel de matraz en el que ambos factores sólo son regulados al principio del cultivo. Además en un biorreactor se puede satisfacer la alta demanda de oxígeno que tiene el hospedero, y obtener altas densidades celulares, por lo que generalmente en un biorreactor se obtienen niveles de producción de 10-100 veces mayores que los que se obtienen en matraz.

Las propiedades bioquímicas de la tanasa de *A. niger* GH1 nativa y recombinante son distintas entre sí, por lo que otras características a estudiar en la tanasa recombinante serían aquellas involucradas en el procesamiento de las modificaciones postraduccionales, es decir cómo afecta la estructura de doble cadena en las propiedades bioquímicas de la tanasa recombinante. Llevando a cabo mutaciones puntuales silenciosas en la secuencia nucleotídica, específicamente en el sitio que codifica para la secuencia de reconocimiento de la proteasa KEX2, se podría producir la tanasa recombinante con estructura de una cadena, tal como en la tanasa nativa de *A. niger* GH1, y así comparar las propiedades de la tanasa nativa y recombinante, ambas de una cadena. Si estas dos tanasas tuvieran propiedades diferentes, éstas podrían ser debidas a diferencias en el grado de glicosilación de las dos proteínas.

Con la tanasa obtenida en el presente trabajo se pueden llevar a cabo estudios de aplicación de la tanasa recombinante producida en alimentos y bebidas que son producidos a bajas temperaturas y/o procesos microbiológicos industriales

## APÉNDICES

### APÉNDICE A:

#### Preparación de medios, soluciones y reactivos

##### Extracción y análisis de ácidos nucleicos

###### **SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sodio)**

Disolver 10 g de SDS y aforar a 100 mL con agua bidestilada. Calentar a 68°C para facilitar su disolución.

###### **Buffer Tris-EDTA (TE pH 8.0, 1X) (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0)**

Mezclar 2 mL de EDTA 0.5 mM pH 8.0 con 10 mL de Tris-Cl pH 8.0). Aforar a 1L con agua destilada. Esterilizar por autoclave y almacenar a temperatura ambiente

###### **EDTA 500 mM pH 8.0**

Disolver 186.1 g de EDTA en 800 mL de agua bidestilada, ajustar el pH a 8.0 con NaOH 10N (o lentejas de NaOH). Aforar a 1000 mL. Esterilizar por autoclave, almacenar a temperatura ambiente. Nota: El EDTA no se disolverá hasta que la solución alcance el pH 8.0

###### **Agarosa 0.8%**

Mezclar 0.8 g de agarosa con 100 mL de TBE 1X. Calentar de 1-2 min. Vaciar en el molde. Dejar solidificar.

###### **Agarosa 2.5%**

Mezclar 2.5 g de agarosa con 100 mL de TBE 1X. Calentar de 1-2 min. Vaciar en el molde. Dejar solidificar.

###### **Buffer TBE, 10X**

Solución Stock 10X. Disolver 108 g de Trizma base, 55 g de ácido bórico y 9.3 g de EDTA en 600 mL de agua bidestilada, aforar a 1000 mL con agua bidestilada y esterilizar en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

###### **Buffer TBE, 1X**

Solución de trabajo 1X: Mezclar 100 mL de TBE 10X y agregar 900 mL de agua bidestilada (Volumen final 1 litro). Almacenar a temperatura ambiente.

###### **SEVAG (Cloroformo-Alcohol isoamílico 24:1)**

Mezclar 24 mL de cloroformo y 1 mL de alcohol isoamílico. No esterilizar.

###### **NaOH (10 N)**

Disolver 10 g de NaOH anhidro en agua ultrapura a 25 mL. Esterilizar por autoclave. Almacenar a temperatura ambiente hasta su uso.

**Solución amortiguadora de lisis (TSNT) (Triton 100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-Cl 100 mM pH 8.8, EDTA 1 mM)**

Disolver 500  $\mu$ L de Triton 100 en 15 mL de agua destilada, posteriormente disolver 146.25 mg de NaCl, agregar 2.5 mL de SDS al 10%, agregar 500  $\mu$ L de Tris-Cl 500 mM pH 8 y 50  $\mu$ L de EDTA 500 mM. Aforar a 25 mL. Esterilizar en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

**Tris-Cl 500 mM pH 8**

Disolver 6.05 g de Tris en 50 mL. Ajustar el pH a 8 con HCl. Aforar a 100 mL con agua bidestilada. Esterilizar por autoclave. Almacenar a 4°C o a temperatura ambiente.

**NaCl 100 mM**

Colocar 5 mL de NaCl 1 M y aforar a 50 mL en un matraz de aforación. Almacenar a temperatura ambiente.

**Gel Red Nucleic Acid 100 X**

Disolver 20  $\mu$ L de Gel Red Nucleic Acid 10000 X(Solución stock) en un volumen final de 2 mL de NaCl 100 mM.

**Transformación en bacterias**

**Méδιο SOC (Tryptona 2%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 10 mM,  $Mg^{2+}$  20 mM, Glucosa 20 mM)**

Disolver 2 g de triptona, 0.5 g de extracto de levadura, 1 mL de NaCl 1 M y 1 mL de KCl 1 M en 97 mL de agua bidestilada. Agitar hasta disolver. Autoclavear y enfriar a temperatura ambiente. Añadir 1 mL de stock de  $Mg^{2+}$  2 M y 1 mL de glucosa 2M, cada uno de estos 2 últimos hasta alcanzar la concentración final de 20 mM. Aforar a 100 mL con agua bidestilada estéril. Almacenar a 4°C o a temperatura ambiente

**NaCl 1 M (Medio SOC, También usado para tinción de ácidos nucleicos)**

Disolver 5.84 g de NaCl y aforar a 50 mL con agua bidestilada. Esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C o a temperatura ambiente

**KCl 1 M (Medio SOC)**

Disolver 3.72 g de KCL y aforar a 50 mL con agua bidestilada. Esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C o a temperatura ambiente

**Glucosa 2 M (Medio SOC)**

Disolver 36.04 g de D-glucosa en 50 mL de agua bidestilada estéril. Aforar a 100 mL con agua bidestilada estéril. Esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C o a temperatura ambiente.

**Stock de  $Mg^{2+}$  2M(Medio SOC)**

Disolver 9.52 g de  $MgCl_2$  y 24.65 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  en 100 mL de agua bidestilada estéril. Esterilizar por filtración.



**CaCl<sub>2</sub> 1 M**

Disolver 11.1 g de CaCl<sub>2</sub> en 80 mL de agua bidestilada. Aforar a 100 mL, esterilizar por autoclave. Almacenar a temperatura ambiente o en frío.

**X-Gal (50 mg/mL)**

Se empleó una solución preparada por Promega (Promega Num. Cat. V3941). Esta solución se empleó directamente del frasco botella. Esta solución es almacenada a -20°C hasta su uso.

**IPTG(10 mM)**

Disolver 238 mg de IPTG (Promega Num. Cat V395A) en 10 mL de agua bidestilada estéril. Esterilizar por filtración y almacenar a -20°C.

**Medio Luria-Bertani (Bactotripton 1%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%)**

Disolver 10 g de bactotripton, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl en 1 Litro de agua bidestilada. Ajustar el pH a 7.5 con NaOH 10 M. Cuando se requiera agar, adicionar a la mezcla anterior 15 g de agar. Esterilizar por autoclave. Enfriar, agregar la ampicilina (100 µg/mL), homogenizar y vaciar 4 mL en tubos corning capacidad 15 mL, o en cajas de Petri. Almacenar a 4°C o temperatura ambiente.

**Ampicilina (25 µg/µL)**

Disolver 250 mg en 10 mL de agua bidestilada previamente esterilizada. Esterilizar por filtración. Almacenar a -20°C hasta su uso.

**Preparación de levaduras electrocompetentes****Sorbitol 1M**

Disolver 9.1 g de sorbitol en 50 mL de agua bidestilada. Esterilizar por autoclave. Almacenar a temperatura ambiente y/o a 4°C.

**HEPES 1 M**

Disolver 2.61 g de DTT en 10 mL de agua bidestilada. Esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C hasta su uso.

**DTT 1M**

Disolver 1.54 g de DTT en 10 mL de agua bidestilada. Esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C hasta su uso.

**Transformación en levaduras****YPD/ YPD agar. (Extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 1%)**

Disolver 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona y 20 g de glucosa en 1000 mL de agua bidestilada. Esterilizar en autoclave a 15 lb/pulg<sup>2</sup>. Almacenar a temperatura ambiente o a 4°C. La vida media de esta solución es de varios meses. Cuando se requiera YPD agar, la mezcla anterior y además 20 g de agar, mezclar bien y esterilizar por autoclave. Dejar enfriar y vertir cuidadosamente en placas Petri. Almacenar a 4°C o a temperatura ambiente.

**10 XD (Glucosa 20%)**

Disolver 20 g de glucosa en 100 mL de agua destilada, esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C.

**Medio RDB y RDBH (Sorbitol 1M, agar 2%, glucosa 2%, YNB 1.34%, biotina 4 x 10<sup>-5</sup>%, aminoácidos 0.005%, ± histidina 0.004%)**

Disolver 93 g de sorbitol y 10 g de agar bacteriológico en 350 mL de agua bidestilada. Esterilizar en autoclave, enfriar y mantener a 60°C. Esterilizar en autoclave 44 mL de agua bidestilada, enfriar y agregar 50 mL de dextrosa 20%, 50 mL YNB 10X, 1 mL de biotina 500X, 5 mL de aminoácidos 100X y precalentar a 45°C. \*Agregar 5 mL de Histidina 100X a la mezcla precalentada, para el crecimiento de cepas his4 (prueba de viabilidad). Adicionar la mezcla precalentada a 45°C, al sorbitol y agar mantenidos a 60°C (345 mL de agua estéril más sorbitol y agar). Homogenizar, vaciar en cajas de Petri, y sellar una vez que solidifica el medio. Almacenar a 4°C o temperatura ambiente.

**Histidina 100X Histidina (0.4%)**

Disolver 400 mg de L-histidina en 100 mL de agua destilada y esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C. La vida media de esta solución es de aproximadamente 1 año.

**Reactivación e inducción en *Pichia pastoris*****Buffer de fosfatos 1M, pH 6**

Disolver 1.03 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 12.8 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 80 mL de agua destilada, ajustar el pH con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> o con KOH, aforar a 100 mL y esterilizar 20 min a 15 lb/pulg<sup>2</sup> a 121°C. Almacenar a temperatura ambiente.

**500X B. (Biotina 0.02%)**

Disolver 20 mg de biotina en 100 mL de agua destilada, esterilizar por filtración y almacenar a 4 °C.

**Glicerol 10%**

Mezclar 100 mL de glicerol absoluto y aforar a 1000 mL de agua destilada. Esterilizar por autoclave. Almacenar a 4°C.

**10X YNB. (Base de levadura nitrogenada con sulfato de amonio y sin aminoácidos 13.4%)**

Disolver 134 g de YNB en 1000 mL de agua destilada, esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C

**Aminoácidos (AA 100X) (0.5% de cada Aminoácido)**

Disolver 500 mg de los siguientes aminoácidos: ácido L-glutámico, L-Metionina, L-Lisina, L-Leucina e Isoleucina en 100 mL de agua. Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C. La vida media de esta solución es aproximadamente 1 año.

**Medio mínimo amortiguado y con glicerol o BMG.(Fosfato de potasio 100 mM pH 6.0 YNB 1.34%, glicerol 1%, biotina  $4 \times 10^{-5}\%$ )**

Para 100 mL de BMG, mezclar 10 mL de buffer de fosfato de potasio 1M pH 6.0, 10 mL de YNB 10X, 0.2 mL de biotina 500X, 10 mL de glicerol 10% y 70 mL de agua destilada estéril. Distribuir en alícuotas y poner de 48-72 h a prueba de esterilidad (30°C), antes de su uso.

**Medio mínimo amortiguado y con metanol o BMM (Fosfato de potasio 100 mM pH 6.0 YNB 1.34%, biotina  $4 \times 10^{-5}\%$ )**

Para 100 mL de BMM, mezclar 10 mL de buffer de fosfato de potasio 1M pH 6.0, 10 mL de YNB 10X, 0.2 mL de B500X, y 80 mL de agua destilada estéril. Distribuir en alícuotas y poner de 48 -72 h a prueba de esterilidad (30°C), antes de su uso.

**Determinación de actividad de tanasa**

**Buffer de Citratos 50 mM pH= 5.0**

Disolver 1.05 g de Ácido Cítrico (P.M. 210.44 g/mol) y 1.47 g de Citrato de Sodio (P.M. 294.11 g/mol) en 180 mL de agua bidestilada. Ajustar con Hidróxido de Sodio 1 M a pH= 5.0. Aforar a 200 mL con agua bidestilada. Almacenar a 4°C hasta su uso.

**Buffer de actividad I (Buffer de Glicina-HCl 250 mM pH = 2.5)**

Disolver 1.87 g de Glicina (P.M. 75.07 g/mol) en 70 mL de agua ultrapura. Ajustar el pH a 2.5 con HCl concentrado. Aforar a un volumen final de 100 mL. Almacenar a 4°C hasta su uso.

**Buffer de actividad II (Buffer de Citratos 50 mM pH = 4.0)**

Disolver 1.05 g de Ácido Cítrico (P.M. 210.44 g/mol) y 1.47 g de Citrato de Sodio (P.M. 294.11 g/mol) en 180 mL de agua ultrapura. Ajustar con Hidróxido de Sodio 1 M a pH= 4.0. Aforar a 200 mL con agua bidestilada. Almacenar a 4°C hasta su uso.

**Buffer de actividad III (Buffer de Citratos 50 mM pH = 5.0)**

Ver Buffer de Citratos 50 mM pH= 5.0

**Buffer de actividad IV (Buffer de Citratos 50 mM pH = 6.0)**

Disolver 1.05 g de Ácido Cítrico (P.M. 210.44 g/mol) y 1.47 g de Citrato de Sodio (P.M. 294.11 g/mol) en 180 mL de agua bidestilada. Ajustar con Hidróxido de Sodio 1 M a pH= 6.0. Aforar a 200 mL con agua bidestilada. Almacenar a 4°C hasta su uso.

**Buffer de actividad V (Buffer de Tris-Cl 100 mM pH = 7.0)**

Disolver 1.21 g de Tris en 70 mL de agua bidestilada. Ajustar con HCl a pH 7.0. Aforar a un volumen final de 100 mL. Almacenar a 4°C hasta su uso.

**Buffer de actividad VI (Buffer de Tris-Cl 100 mM pH = 9.0)**

Disolver 1.21 g de Tris en 70 mL de agua bidestilada. Ajustar con HCl a pH 9.0. Aforar a un volumen final de 100 mL. Almacenar a 4°C hasta su uso.

**Buffer A de elución para cromatografía (Buffer de Citratos 50 mM pH= 5.0)**

Ver Buffer de Citratos 50 mM pH= 5.0

**Buffer B de elución para cromatografía (Buffer de Citratos 50 mM pH= 5.0, NaCl 1 M)**

Disolver 1.05 g de Ácido Cítrico (P.M. 210.44 g/mol) y 1.47 g de Citrato de Sodio (P.M. 294.11 g/mol) y 5.84 g de NaCl en 180 mL de agua bidestilada. Ajustar con Hidróxido de Sodio 1 M a pH= 5.0. Aforar a 200 mL con agua bidestilada. Almacenar a 4°C hasta su uso.

**Metilgalato 10 mM**

Disolver 92.05 mg de Metil-Galato (P.M. 184.1 g/mol) en un volumen final de Buffer de Actividad (I, II, III, IV, V o VI, según sea el caso). Congelar a -20°C hasta su uso.

**Rodanina metanólica 0.667% p/v**

Disolver 333.5 mg de Rodanina metanólica en un volumen final de 50 mL de Metanol absoluto.

**Ácido gálico (Solución stock: 100 mg/L)**

Disolver 5 mg de ácido gálico en 50 mL de Buffer de Citratos 50 mM pH= 5.0

**Ácido gálico (solución de trabajo-estándares)**

De acuerdo a la concentración requerida de estándar de ácido gálico, tomar un volumen de la solución stock de ácido gálico y completar el volumen deseado de estándar con buffer de citratos 50 mM pH= 5.0

**KOH 0.5 N**

Disolver 5.61 g de KOH en 200 mL de agua bidestilada

**Hidróxido de sodio 1M**

Disolver 4 g de Hidróxido de Sodio (40 g/mol) en 100 mL de agua bidestilada.

**Determinación de proteínas totales****Azul brillante de Coomassie (Proteínas totales)**

Disolver 100 mg del colorante azul brillante de Coomassie G-250 en 50 mL de etanol al 95%. Agitar vigorosamente. Agregar 100 mL de ácido fosfórico al 85 %. Mezclar vigorosamente por 20-30 min. Llevar a 1 L con agua destilada, agitar por 20-30 min y filtrar con papel Whatman no. 1 para eliminar el colorante no disuelto. Guardar el reactivo en un frasco oscuro a 4°C.

**Solución de albúmina sérica bovina (1 µg/µL)**

Pesar 5 mg de ASB en un matraz de aforación de 5 mL y aforar con agua destilada.

**Solución de albúmina sérica bovina (50 µg/mL)**

Colocar 250 µL de ASB de 1 µg/µL y aforar a 5 mL con agua destilada.

## **Electroforesis SDS-PAGE**

### **Azul brillante de Coomassie (SDS-PAGE) (Azul brillante de Coomassie R250 0.05%, metanol 50%, ácido acético 10%)**

Disolver 0.05 g de azul brillante de Coomassie R250 en 30 mL de agua bidestilada. Agregar 50 mL de metanol y 10 mL de ácido acético. Aforar a 100 mL. Almacenar a 4°C en un frasco ámbar o cubierto de la luz.

### **Buffer de electroforesis SDS-PAGE 5X**

Pesar 3.8 g de Trizma base, 18.0 g de glicina, 1.3 g de SDS y disolver cuidadosamente en 150 mL de agua bidestilada. Aforar a 250 mL con agua bidestilada. Guardar en refrigeración. Diluir a 1X con agua bidestilada justo antes de usarse.

### **Solución Fijadora (metanol 50%, ácido acético 10%)**

Mezclar 250 mL de metanol, con 50 mL de ácido acético y aforar con agua destilada a 500 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

### **Solución decolorante (metanol 5%, ácido acético 7%)**

Mezclar 50 mL de metanol con 70 mL de ácido acético, y aforar con agua destilada a 1000 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

### **Buffer Tris-Cl/SDS pH 8.8 4X (Solución tampón concentrada para SDS-PAGE)**

Disolver 9.1 g de Trizma base en 30 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado. Aforar a 50 mL con agua bidestilada. Agregar 0.2 g de SDS sólido y disolver. Almacenar a 4°C hasta un mes.

### **Buffer Tris-Cl/SDS pH 6.8 4X (Solución tampón concentrada para SDS-PAGE)**

Disolver 0.605 g de Trizma base en 5 mL de agua. Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado. Aforar a 10 mL con agua destilada. Agregar 0.04 g de SDS sólido y disolver. Almacenar a 4°C hasta un mes.

### **Acrilamida-bisacrilamida**

Se empleó una solución preparada por BIORAD (BIORAD Num. Cat. 161-0154) que contiene los siguientes componentes: Acrilamida 28.5%, N,N'-metilen-bis-acrilamida 1.5% (Ratio 19:1). Esta solución se empleó directamente de la botella. Esta solución es almacenada a 4°C hasta su uso sin desgasificar para geles SDS-PAGE 12 o 15%.

### **Jugo azul (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%)**

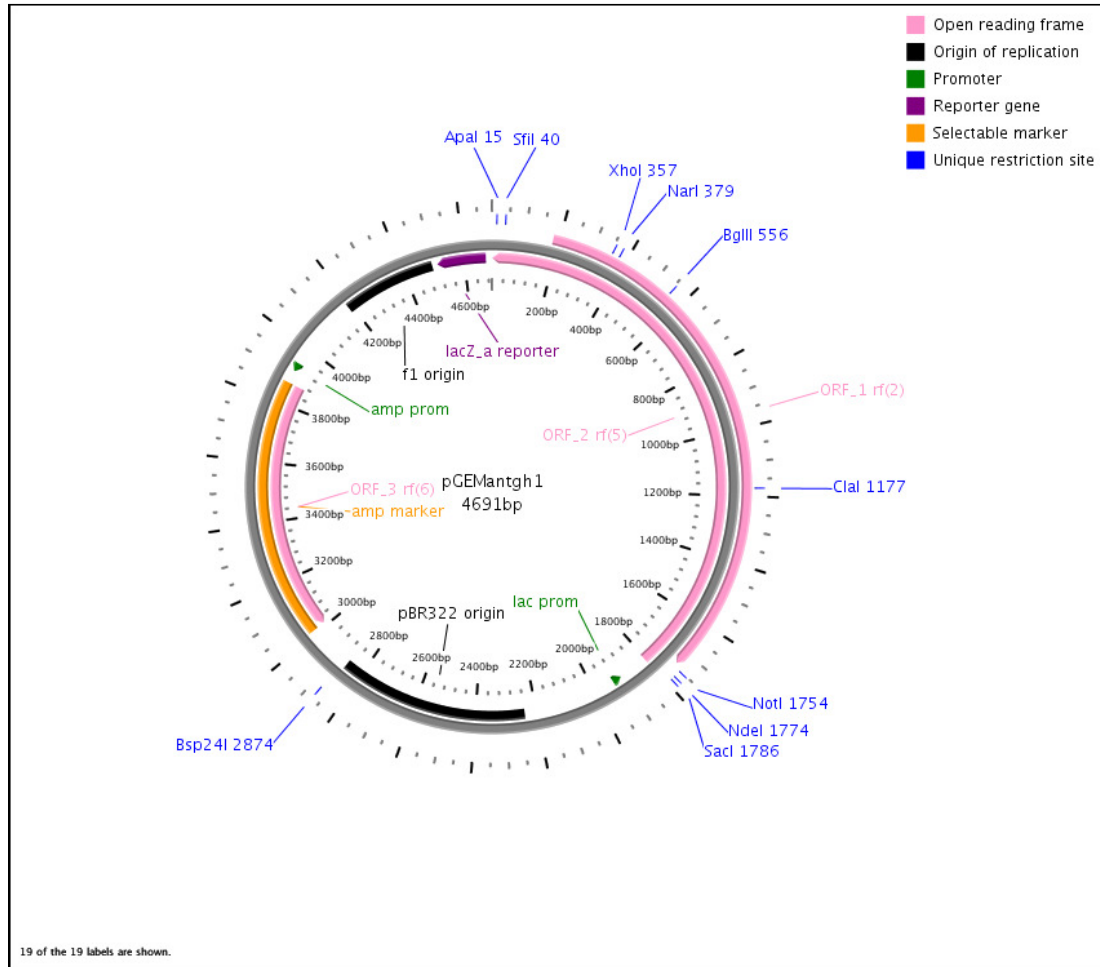
Mezclar 25 mg de azul de bromofenol y 25 mg de xilencianol con 3 mL de glicerol. Aforar con agua bidestilada a 10 mL. Almacenar a 4°C o a temperatura ambiente.

### **Persulfato de amonio (10%)**

Disolver 200 mg de persulfato de amonio en 2 mL de agua bidestilada. Almacenar a 4°C. La vida media de esta solución es aproximadamente 2 semanas.

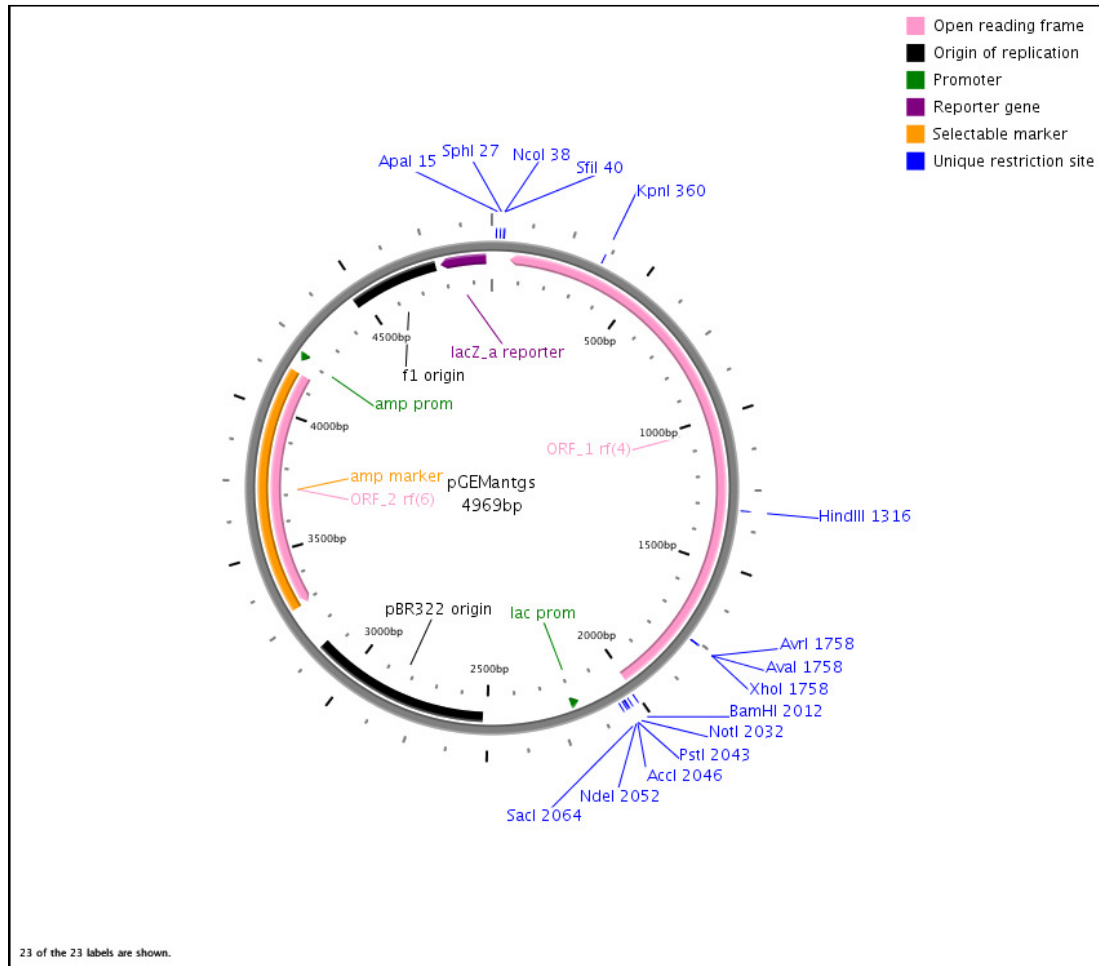
## APÉNDICE B:

### Plásmido pGEMANTGH1



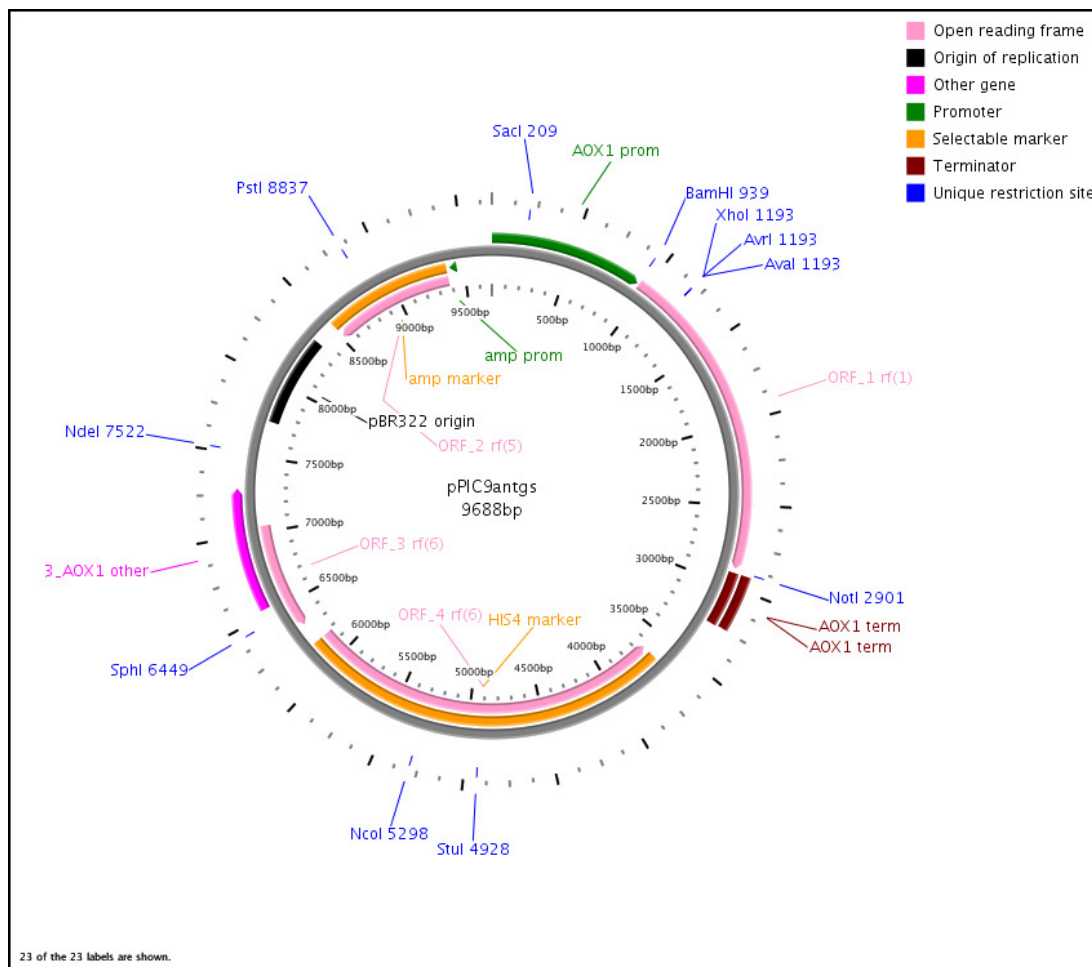
## APÉNDICE C:

### Plásmido pGEMANTgs



## APÉNDICE D:

### Plásmido pPIC9ANTgs





## APÉNDICE E:

### Secuencia nucleotídica y aminoácídica de la tannasa de *A. niger* GH1

LOCUS KP273835 1689 bp DNA linear PLN 08-DEC-2014

DEFINITION *Aspergillus niger*.

ACCESSION KP273835

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE *Aspergillus niger*

ORGANISM *Aspergillus niger*

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;  
Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae;  
*Aspergillus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1689)

AUTHORS Fuentes-Garibay, J.A., Aguilar, C.N., Rodriguez-Herrera, R.,  
Guerrero-Olazarán, M. and Viader-Salvado, J.M.

TITLE Tannase sequence from *Aspergillus niger* GH1 strain

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1689)

AUTHORS Fuentes-Garibay, J.A., Aguilar, C.N., Rodriguez-Herrera, R.,  
Guerrero-Olazarán, M. and Viader-Salvado, J.M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (08-DEC-2014) Instituto de Biotecnología, FCB,  
Universidad Autónoma de Nuevo León, Ave. Pedro de Alba s/n, Col.  
Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León 66450,  
Mexico

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL: jmviader@yahoo.com.mx.  
Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS: 1.

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1689

/organism="Aspergillus niger"

/mol\_type="genomic DNA"

/db\_xref="taxon:5061"

CDS <1..1689

/EC\_number="3.1.1.20"

/note="catalyzes the hydrolysis reaction of the ester  
bonds present in gallotannins, complex tannins, and gallic  
acid esters; [intronless gene]"

/codon\_start=1

/product="tannase"

/translation="TSLSDLCTVSNVQSALPSNGTLLGINLIPSAVTANTVTDASSGM  
GSSGSYDYCNVTVTYTHTGKGDVVKYALPAPSDFKNRFYVAGGGGFSLSDDATGGL  
EYGAASGATDAGYDAFSYSYDEVVLYNGSINWDATYMFYQALGEMTKIAKPLTRGF  
YGLSSDKKIYTYEGCSDGGREGMSQVQRWGDEYDGVIA GAPAFRFAQQQVHHVFPAT  
IEHTMDYPPPCELDKIVNATIEACDPLDGRDTGVSRTDLCMLNFNLTISIIGESYYC

AEQNYTSLGFGFSKRAEGSTTSYQPAQNGSVTAEGVALAQAIYDGLHDSNGKRAYLSW  
 QIAAELSDGDTEYDSTTDSWILSIPSTGGEYVTKFVQLLNIDNLENLDNVTYDTLVDW  
 MNIGMIRYIDSLQTTVIDLTTFKESGGKMIHYHGESDPSIPTASSVHYWQSVRQAMYP  
 NTTYTQSLQDMSNWXLYLVGAAHCGTNSLQPGPYPEDNMEIMIDWVENGKPSRLN  
 ATVSSGTIAGETQMLCQWPSRPLWNSNSFSVHDSKSLATWDYTFDAFKMPVF"

BASE COUNT        336 a        581 c        385 g        387 t

ORIGIN

```

      1 acttccctgt ccgatctctg cactgtttcc aatgttcagt ccgcccttcc ttccaacggc
     61 accctcctgg gaatcaactt gatccctcc gccgtcactg ccaacaccgt caccgatgcc
    121 agctctggca tgggtagctc cggtccctac gactactgca atgtcactgt tacctacacc
    181 cacaccggga aggggtgacaa ggttgctgtg aagtagcccc tgcctgctcc ttccgacttc
    241 aagaaccggt tctacgttgc cgggtggtgt ggtttctccc tgtccagcga tgctactggc
    301 ggtctcagat acggtgctgc ctccggcgcc accgacgccg gctacgacgc cttctcctac
    361 agctatgatg aagtcgtcct ctacggcaac ggctcgatca actgggatgc tacttacatg
    421 ttctcctacc aggtccttgg tgaaatgacc aagatcgcca agccccctgac ccgtggtttc
    481 tacggctctc ccagcgacaa gaagatctac acctactacg agggctgttc cgatggtggt
    541 cgtgagggta tgagtcaggt ccagcgctgg ggagatgaat atgacggtgt cattgccggt
    601 gcccctgcct tccgctttgc tcagcagcag gtccaccacg tcttccttgc cactattgaa
    661 cacaccatgg actactaccc tcccccttgc gaacttgaca agatcgtaa cgctaccatc
    721 gaagcctgtg accctctcga cggccgtacc gatggcgttg tctcccgta tgacctttgc
    781 atgctgaact tcaacctcac ctccatcatt ggcgagtcct actactgcgc tgaacagaac
    841 tacacctccc tgggctttgg cttcagcaag cgtgctgaag gcagcactac tagctaccag
    901 cccgcccgag acggcagcgt caccgctgag ggtgttgctc tcgccaggc catctacgac
    961 ggtcttcacg actctaaccg caagcgtgct tacctctcgt ggcagatcgc cgctgagctg
   1021 tccgatgggt acaccgagta cgactccacc actgactcct ggactctgag catcccctct
   1081 accggtggcg agtacgttac caagtctgtg cagctcctca acatcgataa cctggagaac
   1141 ctcgacaacg tcacctacga caccctggc gactggatga acatcggtat gattcgctac
   1201 atgacagtc tccagaccac cgtcatcgac ctccaccct tcaaggagtc cggtggttaag
   1261 atgatccact accatggtga atccgacccc agtatcccca ccgcctcgtc cgtccactac
   1321 tggcagtcct tccgtcaggc catgtacccc aacaccacct acaccagtc cctgcaggat
   1381 atgtccaact ggtaccagct ctacctcgtc cccggcgctg ctactgcgg taccaactcc
   1441 ctccagcctg gtccttacct cgaggacaac atggagatca tgatcgactg ggttgagaac
   1501 ggcaacaagc cttcccgcct caacgccacc gtctcctccg gcacctatgc tggtagagacc
  1561 cagatgcttt gccagtggcc ttctcgtccc ctctggaaca gcaactccag cttctcttgt
     1621 gtacacgact ccaagtcctt tgctacttgg gactacactt ttgatgcttt caagatgccc
  1681 gttttttaa

```

//

## APÉNDICE F:

### Secuencia nucleotídica de pPIC9

LOCUS Z46233 8020 bp DNA linear PLN 14-NOV-2006  
 DEFINITION P.pastoris DNA for pPIC9 expression vector.  
 ACCESSION Z46233  
 VERSION Z46233.1 GI:559514  
 KEYWORDS beta-lactamase.  
 SOURCE Pichia pastoris  
 ORGANISM [Pichia pastoris](#)  
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomyceta;  
 Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales;  
 Saccharomycetaceae; Pichia.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 7757)  
 AUTHORS Scorer,C.A., Clare,J.J., McCombie,W.R., Romanos,M.A. and  
 Sreekrishna,K.  
 TITLE Rapid selection using G418 of high copy number transformants of  
 Pichia pastoris for high-level foreign gene expression  
 JOURNAL Biotechnology (N.Y.) 12 (2), 181-184 (1994)  
 PUBMED [7764433](#)  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 8020)  
 AUTHORS Romanos,M.A.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (18-OCT-1994) Romanos M. A., Wellcome Research  
 Laboratories, Biology Division, Langley Court, Beckenham, Kent, UK,  
 BR3 3BS  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..8020  
 /organism="Pichia pastoris"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /db\_xref="taxon:[4922](#)"  
 /clone="pPIC3"  
[misc\\_feature](#) 1..8020  
 /standard\_name="pPIC9"  
 /function="Pichia alpha-factor secretion vector"  
 /label=pPIC9  
[terminator](#) 1..354  
 /standard\_name="AOX1"  
[CDS](#) complement (1250..3280)  
 /standard\_name="HIS4"  
 /codon\_start=1  
 /protein\_id="[CAA86304.1](#)"  
 /db\_xref="GI:559515"  
 /db\_xref="GOA:[Q12201](#)"  
 /db\_xref="HSSP:[P06988](#)"  
 /db\_xref="InterPro:[IPR001692](#)"  
 /db\_xref="InterPro:[IPR002496](#)"  
 /db\_xref="InterPro:[IPR008179](#)"  
 /db\_xref="UniProtKB/TrEMBL:[Q12201](#)"  
 /translation="MTFPLLPAYASVAEFDNSLSLVGKAVFPYAADQLHNLIKFTQST  
 ELQVNVQVESSVTEDQFEELIDNLLKLYNNGINEVILDLDLAERVVQRMIPGARVIYR  
 TLVDKVASLPANASIAVPFSSPLGDLKSFTNGGSRVYAFSETAKLVDTVSTVASGII  
 PIIDARQLTTEYELSEDVKKFPVSEILLASLTDRPDGLFTTLVADSSNYSGLVYSS  
 KKSIPAEARTQTGVYQSRRHGLWYKGATSGRTQKLLGIELDCDGDCLKFVVEQTVGVF  
 CHLERTSCFGQSKGLRAMEAPCGIVRAMLQKVLIPNGYLTTFCLNAKIREEAEELAE  
 AKSKEDIAWECADLFYFALVRCACYGVTLDEVERNLDMKSLSKVTRRGDAKPGYTKEQ  
 PKEESKPKEVPSEGRIELCKIDVSKASSQEIEDALRRPIQKTEQIMELVKP IVDNVRQ  
 NGDKALLELTAKFDGVALKTPVLEAPFPEELMQLPDENVKRAIDLSDIDNVRKFHEAQLT  
 ETLQVETCPGVVCSRFPARPIEKVGLYIPGGTAILPSTSLMLGVPAKVAGCKEIVFASP  
 PKKDGTILTPEVIYVAHKVGAKCIVLAGGAQAVAMAYGTETVPKCDKIFGPGNQFVTA  
 AKMMVQNDTSALCSIDMPAGPSEVLVIADKYADPDFVASDLLLKLNMVLIPR"  
[misc\\_feature](#) 3589..4036  
 /standard\_name="3' AOX1"  
[mRNA](#) complement (5606..6466)  
 /product="beta-lactamase"  
 /standard\_name="AmpR"  
[promoter](#) 6766..7703

```

/standard_name="AOX1"
sig_peptide 7727..7979
/standard_name="alpha factor leader"
ORIGIN
1 gcggccgcga attaatcgc cttagacatg actgttcctc agttcaagtt gggcacttac
61 gagaagaccg gtcttgctag attctaataca agaggatgtc agaatgccat ttgcctgaga
121 gatgcaggct tcatttttga tactttttta tttgtaacct ataatgtata ggattttttt
181 tgtcattttg tttcttctcg tacgagcttg ctctgatca gcctatctcg cagctgatga
241 atatcttggt gtaggggttt gggaaaatca ttcgagtttg atgtttttct tggattttcc
301 cactcctctt cagagtacag aagattaagt gagaagttcg tttgtgcaag cttatcgata
361 agctttaatg cggtagttta tcacagttaa attgctaacg cagtcaggca ccgtgtatga
421 aatctaacaa tgcgctcatc gtcactctcg gcaccgtcac cctggatgct gtaggcatag
481 gcttggttat gccggtactg ccgggcctct tgcgggatat cgtccattcc gacagcatcg
541 ccagtacta tggcgtgctg ctacgcgtat atgctgtgat gcaatttcta tgcgcacccg
601 ttctcggagc actgtccgac cgttttgcc gccgccagt cctgctcgct tcgctacttg
661 gagccactat cgactacgcg atcatggcga ccacacccgt cctgtggatc tatcgaatct
721 aaatgtaagt taaaatctct aaataattaa ataagtccca gtttctccat acgaacctta
781 acagcattgc ggtgagcatc tagaccttca acagcagcca gatccatcac tgcctggcca
841 atatgtttca gtcctcagg agttacgtct tgtgaagtga tgaacttctg gaaggttgca
901 gtgttaactc cgctgtattg acggcatat ccgtagcttg gcaaagtgtg gttggtagcg
961 gaggagtaat ctccacaact ctctggagag taggcaccaa caaacacaga tccagcgtgt
1021 tgtacttgat caacataaga agaagcattc tcgatttgca ggaatcaagt ttcaggagcg
1081 tactgattgg acatttccaa agcctgctcg taggttgcaa ccgatagggt tgtagagtgt
1141 gcaatacact tgcgtacaat ttcaaccctt ggcaactgca cagcttggtt gtggaacaga
1201 tcttcaattc tggcaagctc cttgtctgtc atatcgacag ccaacagaat cacctgggaa
1261 tcaataccat gttcagcttg agcagaaggt ctgaggcaac gaaatctgga tcagcgtatt
1321 tatcagcaat aactagaact tcagaaggcc cagcaggcat gtcaatacta cacagggctg
1381 atgtgtcatt ttgaaccatc atcttggcag cagtaacgaa ctggtttctt ggaccaataa
1441 ttttgtcaca cttaggaaca gtttctgttc cgtaagccat agcagctact gcctgggcgc
1501 ctctgctag cacgatacac ttagcaccaa ccttgtgggc aacgtagatg acttctgggg
1561 taagggtacc atccttctta ggtggagatg caaaaacaat ttctttgcaa ccagcaactt
1621 tggcaggaac acccagcatc agggagtggt aaggcagaat tgcggttcca caggaatat
1681 agaggccaac tttctcaata ggtcttgcaa aacgagagca gactacacca gggcaagtct
1741 caacttgcaa cgtctcgtt agttgagctt catggaattt cctgacgtta tctatagaga
1801 gatcaatggc tctcttaacg ttatctggca attgcataag ttctctggg aaaggagctt
1861 gtaacacagg tgtcttcaaa cgcactccat caaacttgcc agttagttct aaaaggctt
1921 tgtcaccatt ttgacgaaca ttgtcgacaa ttggtttgac taattccata atctgttccg
1981 ttttctggat aggacgacga agggcatctt caatttcttg tgaggaggcc ttagaaacgt
2041 caattttgca caattcaata cgaccttcag aagggaactt tttaggtttg gattcttctt
2101 taggttggtt cttggtgtat cgtgcttggt catctcctt ccttctagt acctttaggg
2161 acttcatatc caggtttctc tccacctcgt ccaacgtcac accgtacttg gcacatctaa
2221 ctaatgcaaa ataaaataag tcagcacatt ccaggctat atcttcttg gatttagctt
2281 ctgcaagttc atcagcttcc tccctaattt tagcgttcaa acaaaacttc gtcgtcaaat
2341 aacogtttgg tataagaacc ttctggagca ttgctcttac gatccacaa ggtgttcca
2401 tggctctaag accctttgat tggccaaaac aggaagtgcg ttccaagtga cagaaaccaa
2461 cacctgtttg ttcaaccaca aatttcaagc agtctccatc acaatccaat tcgataccca
2521 gcaacttttg agttcgtcca gatgtagcac ctttatacca caaacctgta cgacgagatt
2581 ggtagactcc agttttgtgc cttatagcct ccggaataga ctttttgac catcacacca
2641 ggcccaacga gtaattagaa gagtcagcca ccaaagtagt gaatagacca tcggggcggt
2701 cagtagtcaa agacgccaac aaaatttcac tgacagggaa ctttttgaca tcttcagaaa
2761 gttcgtattc agtagtcaat tgccgagcat caataatggg gattatacca gaagcaacag
2821 tgggaagtca atctaccaac tttgcggtct cagaaaaagc ataaacagtt ctactaccgc
2881 cattagttaa acttttcaaa tcgccagtg gagaagaaaa aggcacagcg atactagcat
2941 tagcgggcaa gtagtcaact ttatcaacca gggctctata gataacccta gcgcctggga
3001 tcatcctttg gacaactctt tctgccaat ctagggtcaa aatcacttca ttgataccat
3061 tattgtacaa cttgagcaag ttgtcgatca gctcctcaa ttggtcctct gtaacggatg
3121 actcaacttg cacattaact tgaagctcag tcgattgagt gaacttgatc aggttgtgca
3181 gctggtcagc agcataggga aacacggctt ttcttaccaa actcaaggaa ttatcaact
3241 ctgcaacact tgcgtatgca ggtagcaagg gaaatgtcat acttgaagtc ggacagttag
3301 ttagtcttg agaaattctg aagcgttatt tttattatca gtgagtcagt catcaggaga
3361 tctctacgc cgacgcctc gtggccggca tcaccggcgc cacagggtcg gttgtggcg
3421 cctatatcgc cgacatcacc gatggggaag atcgggctcg ccacttcggg ctcatgagcg
3481 cttgtttcgg cgtgggtatg gtggcaggcc ccgtggccgg gggactgttg ggcgccatct
3541 ccttgcatgc accattcctt gcggcggcgg tgctcaacgg cctcaaccta ctactgggt
3601 gcttctaat gcaggagtcg cataagggag agcgtcgagt atctatgatt ggaagtagg
3661 gaatggtgat acccgcatc ttcatgtct tgaggtctcc tatcagatta tgcccaacta
3721 aagcaaccgg agggaggat ttcatggtaa atttctctga cttttgtgca tcagtagact
3781 cgaactgtga gactatctcg gttatgacag cagaaatgtc cttcttgagg acagtaaatg
3841 aagtcccacc aataaagaaa tccttgttat caggaaacaa cttcttggtt cgaacttttt
3901 cgggtgcctt aactataaaa tgtagagtgg atatgtcggg taggaatgga gcgggcaaat
3961 gcttaccttc tggaccttca agaggtatgt agggtttgta gatactgatg ccaacttcag

```

4021 tgacaacggtt gctatttctgt tcaaaccatt ccgaatccag agaaatcaaa gttgtttgtc  
4081 tactattgat ccaagccagt gcggtcttga aactgacaat agtgtgctcg tgttttgagg  
4141 tcatctttgt atgaataaat ctagtctttg atctaaataa tcttgacgag ccaaggcgat  
4201 aaatacccaa atctaaaact cttttaaaac gttaaaagga caagtatgtc tgccgtgtatt  
4261 aaaccccaaa tcagctcgta gtctgatcct catcaacttg aggggcacta tcttgtttta  
4321 gagaaatttg cggagatgcg atatcgagaa aaaggtacgc tgattttaaa cgtgaaattt  
4381 atctcaagat ctctgcctcg cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca  
4441 gctcccgagg acgggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac aagcccgta  
4501 gggcgctca gcggtgttg gcggtgtcg gggcgagcc atgacccagt cacgtagcga  
4561 tagcggagtg tatactggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac  
4621 catatgagggt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgctct  
4681 tccgcttctt cgctcactga ctcgctgcgc tccgtctgtt ggtgctgagc agcggatca  
4741 gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaac  
4801 atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa agcccgctt gctggcgtt  
4861 ttccataggg tccgcccccg cagactata aagataccag gcttttcccc ctggaagctc  
4921 cgaacccgga cagactata aagataccag gcttttcccc ctggaagctc cctcgctgcg  
4981 tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc  
5041 gtggcgcttt ctcaatgctc acgctgtagg tatctcagtt cgtgtagggt cgttcgctcc  
5101 aagctggggt gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc gctgctgctt atccggtaac  
5161 tatcgtcttg agtccaaccc ggttaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt  
5221 aacaggatta gcagagcagc gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct  
5281 aactacggct acactagaag gacagtattt ggtatctgct ctctgctgaa gccagttacc  
5341 ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgg  
5401 ttttttgggt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaa gatctcaaga agatcctttg  
5461 atcttttcta cggggtctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggct  
5521 atgagattat caaaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa  
5581 tcaatctaaa gtatatatga gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag  
5641 gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgctgact ccccgctgtg  
5701 tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga  
5761 gacccacgct caccgctccc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag  
5821 cgcagaagtg gtctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgcccggaa  
5881 gctagagtaa gtagtctgcc agttaaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tctgcaggc  
5941 atcgtggtgt cagcgtcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca  
6001 aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaagcgg ttagtctctt cggctctccg  
6061 atcgttgtca gaagtaagtt ggcgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat  
6121 aattctctta ctgtcgaaga atccgtaaga tgcttttctg tgactggtag tcaactaac  
6181 aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaacacgg  
6241 gataataacc cgccacatag cagaacttta aaagtgtcga tcattggaaa acgttcttct  
6301 gggcgaaaaa tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccaactcg  
6361 gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaa  
6421 ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaatgttg aataactata  
6481 ctcttctctt tccaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac  
6541 atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa  
6601 gtgccacctg acgtctaaga accattatt atcatgacat taacctataa aatatggcgt  
6661 atcacgaggg cctttcgtct tcaagaatta attctcatgt ttgacagctt atcatcgata  
6721 agctgactca tgttggtatt gtgaaataga cgcagatcgg gaacactgaa aaataacagt  
6781 tattattcga gatctaact ccaaaagcga aaggttgaat gaaacctttt tgccatccga  
6841 catccacagg tccattctca cacataagtg ccaaacgcaa caggaggga tacactagca  
6901 gcagaccggt gcaaacgcag gacctccact cctcttctcc tcaacacca cttttgccat  
6961 cgaaaaacca gccagttat tggccttgat tggagctcgc tcattccaat tcttctatt  
7021 aggtactaa caccatgact ttattagcct gtctatctg gccccctgg cgaggttcat  
7081 gtttgtttat ttccgaatgc aacaagctcc gcattacacc cgaacatcac tccagatgag  
7141 ggctttctga gtgtgggttc aaatagtttc atgttcccca aatggcccaa aactgacagt  
7201 ttaaacgctg tcttggaacc taatatgaca aaagcgtgat ctcatccaag atgaactaag  
7261 tttggttctg tgaaatgcta acggccagtt ggtcaaaaag aaacttccaa aagtgcctat  
7321 accgtttgtc ttgtttggtg ttgattgacg aatgctcaaa aataatctca ttaatgctta  
7381 gcgcagcttc tctatcgctt ctgaaccccg gtgcacctgt gccgaaacgc aaatggggaa  
7441 acacccgctt tttggatgat tatgcattgt ctccacattg tatgcttcca agattctggt  
7501 gggaatactg ctgatagcct aacgttcagt atcaaaattt aactgttcta acccctactt  
7561 gacagcaata tataaacaga aggaagctgc cctgtcttaa accttttttt ttaactcat  
7621 tattagctta ctttcataat tgcgactggt tccaattgac aagcttttga ttttaacgac  
7681 ttttaacgac aacttgagaa gatcaaaaa caactaatta ttcgaaggat ccaaacgatg  
7741 agatttctct caatttttac tgcagtttta ttcgcagcat cctccgcat agctgctcca  
7801 gtcaacacta caacagaaga tgaacggcga caaattccgg ctgaagctgt catcggttac  
7861 tcagatttag aaggggtatt cgaatgtgct gttttgcca tttccaacag cacaataaac  
7921 gggttattgt ttataaatac tactattgcc agcattgctg ctaagaaga aggggtatct  
7981 cgagaaaaga gaggctgaag cttacgtaga attccctag

## LITERATURA CITADA

1. Aguilar CN, Gutiérrez-Sánchez G. 2001. Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. *Food SciTechnol Int* 7:373–382.
2. Aguilar CN, Rodríguez R, Gutiérrez-Sánchez G, Augur C, Favela-Torres E, Prado-Barragán LA, Contreras-Esquivel JC. 2007. Microbial tannases: advances and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 47-59.
3. Albertse EH. 2002. Cloning, expresion and carактерization oftannase from *Aspergillus* species. M.Sc. Thesis, Department of Microbiology and Biochemistry, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of the Free State, Bloemfontein, SouthAfrica.
4. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
5. Ayded L., Hamdi M. 2002. Culture conditions of tannase production by *Lactobacillus plantarum*. *Biotechnology Letters* 24: 1763-1765.
6. Bajpai B., Patil S. 1997. Introduction of tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity in some members of fungi imperfecti. *Enzyme Microb Technol* 20: 612–614.
7. Banerjee D, Mahapatra S. 2012. Fungal tannase: a journey from strain isolation toenzyme applications. *Dyn. Biochem. Process Biotechnol. Mol. Biol.* 6: 49–60.
8. Barthomeuf C, Regerat F, Pourrat H. 1994. Production, purification and characterization of a tannase from *Aspergillus niger* LCF 8. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77(3):320–323.
9. Battestin V, Macedo GA. 2007. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by *Paecilomyces variotii*. *Electronic Journal of Biotechnology* 10(2): 191–199.
10. Begovic S., Duzic E. 1976. Experimental proof of tanin decomposition owing to ferments present in mucosa of the rumen in bovines. *Vetenaria (Yugoslavia)* 25: 421-428.

11. Belmares R., Contreras-Esquivel J.C., Rodríguez-Herrera R., Ramírez-Coronel A., Aguilar C.N. 2004. Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. *Lebensm Wiss Technol* 37: 857–864.
12. Beniwal V, Chhokar V. 2010. Statistical optimization of culture conditions for tannase production by *Aspergillus awamori* MTCC 9299 under submerged fermentation. *Asian J. Biotechnol.* 2: 46-52.
13. Beniwal V, Kumar A, Goel G, Chhokar V. 2013. A novel low molecular weight acido-thermophilic tannase from *Enterobacter cloacae* MTCC 9125. *Biocatal.Agric. Biotechnol.* 2, 132–137.
14. Bhat TK, Singh B, Sharma OP. 1998. Microbial degradation of tannins: A current perspective. *Biodegradation*, 9(5), 343–357.
15. Böer E, Bode R, Mock HP, Piontek M, Kunze G. 2009. Atan1p: An extracellular tannase from the dimorphic yeast *Arxula adeninivorans*. Molecular cloning of the ATAN1 gene and characterization of the recombinant enzyme. *Yeast*, 26(6): 323–337.
16. Canterelli, C., Brenna, O., Giovanelli, G., Rossi, M. (1989). Beverage stabilization through enzymatic removal of phenolics. *Food Biotechnol.*, 3, 203 – 213.
17. Chae S, Yu T (1983) Experimental manufacture of a com wine by fungal tannase. *Hanguk Sipkum Kwahakoechi* 15:326–332.
18. Chávez-González M, Rodríguez-Durán LV, Balagurusamy N, Prado-Barragán A, Rodríguez R, Contreras JC, Aguilar CN. 2012. Biotechnological advances and challenges of tannase: an overview. *Food Bioprocess Technol.* 5: 445-459.
19. Chowdhury SP, Khanna S, Verma SC, 2004. Molecular diversity of tannic acid degrading bacteria isolated from tannery soil. *J. Appl. Microbiol.* 97, 1210–1219.
20. Clare JJ, Rayment FB,. Bollantine SP, Sreekrishna K, Romanos MA. 1991. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology* 9: 455-460.
21. Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY, Madden KR. 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol. Cell. Biol.* 5(12): 3376-85.

22. Cregg JM, Russell KA. 1998. Transformation, in *Methods in Molecular Biology*, vol 103: *Pichia* Protocols (Higgins, D.R., and Cregg, J.M, ed). Humana Press Inc, Totowa, NJ: pp. 27-39.
23. Cruz-Hernández M, Augur C, Rodríguez R, Contreras-Esquivel JC, Aguilar CN. 2006. Evaluation of culture conditions for tannase production by *Aspergillus niger* GH1. *Food Technol Biotechnol*. 44: 541-544.
24. Cruz-Hernández M, Contreras-Esquivel JC, Lara F., Rodriguez R, Aguilar CN. 2005. Isolation and evaluation of tannin-degrading fungal strains from the Mexican desert. *Z .Naturforsch. C* 60: 844-848.
25. Cruz-Hernández MA, Contreras JC, Lima N, Teixeira JA, Aguilar CN. 2009. Production of *Aspergillus niger* GH1 tannase using solid-state fermentation. *J. Pure Appl. Microbiol*. 3: 21-26.
26. Curiel J.A., Rodríguez H., Acebrón I., Mancheño J.M., De Las Rivas B., Muñoz R. 2009. Production and physicochemical properties of recombinant *Lactobacillus plantarum* tannase. *J Agric Food Chem*. 57(14): 6224-30.
27. Daly R, Hearn MT. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit*. 18: 119-138.
28. Darah I, Sumathi G, Jain K, Hong LS. 2011. Involvement of physical parameters in medium improvement for tannase production by *Aspergillus niger* FETL FT3 in submerged fermentation. *Biotechnol. Res. Int*. 2011.
29. Das Mohapatra, P.K., Maity, C., Rao, R.S., Pati, B.R., Mondal, K.C., 2009. Tannase production by *Bacillus licheniformis* KBR6: Optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. *Food Res. Int*. 42: 430–435.
30. Deschamps A.M., Otuk G., Lebeault J.M. 1983. Production of tannase and degradation of chestnut tannin by bacteria. *Journal of Fermentation Technology* 61: 55–59.
31. Digan ME, Laair SV, Brierly RA, Siegel RS, Williams ME, Ellis SB, Kellaris PA, Prorow SA, Craig WS, Velicelebi G, Harpold MM, Thill GP. 1989. Continuous production of a novel lisozyme via secretion from the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 7:160-164.



32. Escamilla-Treviño LL, Viader-Salvadó JM, Barrera-Saldaña HA, Guerrero-Olazarán M. 2000. Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*. Biotechnol. Lett. 22: 109-114.
33. Escamilla-Treviño LL, Viader-Salvadó JM, Guerrero-Olazarán M. 1999. Producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*. CIENCIA UANL 2(2):27-33.
34. Farias GM, Gorbea C, Elkins JR, Griffin, GJ. 1994. Purification, characterization, and substrate relationships of the tannase from *Cryphonectria parasitica*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 44(1): 51–63.
35. Field JA, Lettinga G. 1992. Biodegradation of tannins. In H.Sigel (Ed.), Metal ions in biological systems, vol 28. Degradation of environmental pollutants by microorganisms and their metalloenzymes. (pp. 61–97). New York: Marcel Dekker.
36. Flores-Gallegos AC, Castillo-Reyes F, Lafuente, CB, Loyola-Licea JC, Reyes-Valdés MH, Aguilar CN, Rodríguez-Herrera R. 2012. Invertase production by *Aspergillus* and *Penicillium* and sequencing of an inv gene fragment. Micol. Apl. Int. 24: 1-10.
37. Fuentes-Garibay JA. 2011. Construcción de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* productoras de un tripsinógeno quimérico. Tesis de Maestría en Ciencias de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
38. Giovanelli G. 1989. Enzymatic treatment of malt polyphenols for stabilization. Ind. Bevande. 18: 497 –502.
39. Goel G, Puniya AK, Aguilar CN, Singh K. 2005. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. Naturwissenschaften 92:497–503.
40. Goel G, Puniya AK, Singh K. 2007. Phenotypic characterization of tannin–protein complex degrading bacteria from faeces of goat. Small Rumin Res 69:217–220.
41. Guerrero-Olazarán M., Escamilla-Treviño L.L., Castillo-Galván M., Gallegos-López J.A., Viader-Salvadó J.M. 2009. Recombinant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) trypsinogen production in *Pichia pastoris*. Biotechnol. Prog. 25: 1310-1316.

42. Guerrero-Olazarán M., Rodríguez-Blanco L., Carreon-Treviño J.G., Gallegos-López J.A., Viader-Salvadó J.M. 2010. Expression of *Bacillus* phytase C gene in *Pichia pastoris* and properties of the recombinant enzyme. Appl. Environ. Microbiol. 76(16): 5601-5608.
43. Guex N, Peitsch MC. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. Electrophoresis 18: 2714-2723.
44. Guo M, Hang H, Zhu T, Zhuang Y, Chu J, Zhang S. 2008. Effect of glycosylation on biochemical characterization of recombinant phytase expressed in *Pichia pastoris*. Enzyme Microb. Technol. 42: 340-345.
45. Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symp. Ser. 41: 95-98.
46. Hatamoto O, Watarai T, Kikuchi M, Mizusawa K, Sekine H. 1996. Cloning and sequencing of the gene encoding tannase and a structural study of the tannase subunit from *Aspergillus oryzae*. Gene 175: 215-221.
47. Iibuchi S, Minoda Y, Yamada K. 1972 Hydrolyzing pathway, substrate specificity and inhibition of tannin acyl hydrolase. Agric Biol Chem 32:803–809.
48. Iwamoto K, Tsuruta H, Nishitani Y, Osawa R. 2008. Identification and cloning of a gene encoding tannase (tannin acyl hydrolase) from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 T. Systematic and Applied Microbiology, 31(4), 269–277.
49. Jahic M, Wallberg F, Bollok M, Garcia P, Enfors SO. 2003. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. Microbial Cell Factories, 2(1), 6.
50. Jana A, Maity C, Halder SK, Pati BR, Mondal KC, Das Mohapatra PK. 2012. Rapid screening of tannase producing microbes by using natural tannin. Braz. J. Microbiol. 43, 1080–1083.
51. Joseph JK, Abolaji J, 1997. Effect of replacing maize with graded levels of cooked Nigerian mango-seed kernels (*Mangifera indica*) on the performance, carcass yield and meat quality of broiler chickens. Bioresour. Technol. 61, 99–102.

52. Kannan N, Aravindan R, Viruthagiri T. 2011. Effect of culture conditions and kinetic studies on extracellular tannase production by *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407. Indian J. Biotechnol. 10: 321-328.
53. Kasieczka-Burnecka M, Kuc K, Kalinowska H, Knap M, Turkiewicz M. 2007. Purification and characterization of two cold-adapted extracellular tannin acyl hydrolases from an Antarctic strain *Verticillium* sp. P9. Applied Microbiology and Biotechnology, 77(1): 77–89.
54. Kelley LA, Sternberg MJ. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. Nat. Protoc. 4: 363-371.
55. Korpassy, B., 1961. Tannins as hepatic carcinogens. Prog. Exp. Tumor Res. 2, 245.
56. Lekha P.K., Lonsane B.K. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: State of the art. Advances in Applied Microbiology 44: 215–260.
57. López M., Guerrero-Olazarán M., Viader-Salvadó J.M., Gallegos-López J.A., Favela-Torres E., Fernández F.J., Loera O., Viniegra-González G. 2010. Cell growth and *Trametes versicolor* laccase production in transformed *Pichia pastoris* cultured by solid-state or submerged fermentations. J. Chem. Technol. Biotechnol. 85(4): 435-440.
58. López-Ríos GF. 1984. Fitoquímica, 1st edn. Universidad Autónoma de Chapingo, Estado de México, p 13.
59. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. 2005 Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. Yeast 22: 249-270.
60. Madhavakrishna W., Bose S., Nayudamma, Y. 1960. Estimation of tannase and certain oxidising enzymes in Indian vegetables tanstuffs. Bulletin of Central Leather Research Institute. 7: 1-11.
61. Mata-Gómez M, Rodríguez LV, Ramos EL, Renovato J, Cruz-Hernández MA, Rodríguez R, Aguilar CN. 2009. A novel tannase from the xerophilic fungus *Aspergillus niger* GH1. J. Microbiol. Biotechnol. 1: 1-10.

62. Matoba Y, Tanaka N, Noda M, Higashikawa F, Kumagai T, Sugiyama M. 2013. Crystallographic and mutational analyses of tannase from *Lactobacillus plantarum*. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* 81: 2052–2058.
63. Mendez A. 1984. Energía metabolizable del sorgo y efecto de la adición de aceite a dietas con sorgo dulce o amargo. *Avances de investigación (resúmenes)*, Colegio de Postgraduados.
64. Mizuno T, Shiono Y, Koseki T. 2014. Biochemical characterization of *Aspergillus oryzae* native tannase and the recombinant enzyme expressed in *Pichia pastoris*. *J. Biosci. Bioeng.* 118: 392–395.
65. Mondal KC, Banerjee R, Pati BR. 2000. Tannase production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Lett.* 22: 767–769.
66. Montesino R, García R, Quintero O, Cremata JA. 1998. Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 14: 197–207.
67. Mueller–Harvey I, Reed JD, Hartley LD. 1987. Characterization of phenolic compounds, including tannins of ten ethiopian browse species by high performance liquid chromatography. *Journal of the Sci. Food Agric.*, 39: 1–14.
68. Nadaf NH, Ghosh JS. 2011. Production, purification and characterization of tannase from *Rhodococcus* NCIM 2891. *Curr. Res. J. Biol. Sci.* 3, 246–253.
69. Nierenstein, M. 1930. Galls. *Nature.* 125: 348–342.
70. Nip WK, Burns EE. 1969. Pigment characterization in grain sorghum, I. Red varieties. *Cereal Chem* 46:490–495.
71. Nishitani Y., Osawa, R. 2003. A novel colorimetric method to quantify tannase activity of viable bacteria. *Journal of Microbiological Methods.* 54 (2): 281–284.
72. Noguchi, N., Ohashi, T., Shiratori, T., 2007. Association of tannase-producing *Staphylococcus lugdunensis* with colon cancer and characterization of a novel tannase gene. *J. Gastroenterol.* 42: 346–351.
73. O’Callaghan J., O’Brien M.M., McClean K., Dobson A.D. 2002. Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29: 55–59.

74. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8: 785-786.
75. Pourrat H., Regerat F., Pourrat A., Jean D. 1985. Production of gallic acid from tara tannin by a strain of *A. niger*. *Journal of Fermentation Technology* 63: 401–403.
76. Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C. *et al.* 2012. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 40: D290-D301.
77. Purohit, J.S., Dutta, J.R., Nanda, R.K., Banerjee, R., 2006. Strain improvement for tannase production from co-culture of *Aspergillus foetidus* and *Rhizopus oryzae*. *Bioresour. Technol.* 97, 795–801.
78. Ramírez-Coronel A, Marnet N, Kumar V, Rousses S, Guyot S, Augur C. 2004. Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arabica*) by thiolysis-high performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 52:1344–1349.
79. Ramirez-Coronel MA, Viniegra-Gonzalez G, Darvill A, Augur C. 2003. A novel tannase from *Aspergillus niger* with  $\beta$ -glucosidase activity. *Microbiology* 149:2941–2946.
80. Ramos EL, Mata-Gómez MA, Rodríguez-Durán LV, Belmares RE, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN. 2011. Catalytic and thermodynamic properties of a tannase produced by *Aspergillus niger* GH1 grown on polyurethane foam. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165: 1141-1151.
81. Ren B, Wu M, Wang Q, Peng X, Wen H, McKinsty WJ, Chen Q. 2013. Crystal structure of tannase from *Lactobacillus plantarum*. *J. Mol. Biol.* 425: 2737–2751.
82. Renovato J, Gutiérrez-Sánchez G, Rodríguez-Durán LV, Bergman C, Rodríguez R, Aguilar CN. 2011. Differential properties of *Aspergillus niger* tannase produced under solid-state and submerged fermentations. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165: 382-395.
83. Romanos MA. 1995. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high level gene expression. *Curr. Opin. Biotech.* 6:527-533.

84. Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
85. Sanchez EE 2001. Applications and potential uses of tannase and tannins (in Spanish). B.Sc. thesis, Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coah, p 25.
86. Sharma S, Bhat TK, Dawra RK. 2000. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. *Anal. Biochem.* 279: 85-89.
87. Sharma S, Gupta MN. 2003 Synthesis of antioxidant propyl gallate using tannase from *Aspergillus niger* van Teighem in non aqueous media. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13: 395-397.
88. Sivashanmugam K, Jayaraman G. 2013. Production and partial purification of extracellular tannase by *Klebsiella pneumoniae* MTCC 7162 isolated from tannery effluent. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 1364-1374.
89. Skene IK., y Brooker JD. 1995. Characterization of tannin acyl hydrolase activity in the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Anaerobe* 1(6): 321–327.
90. Sreekrishna K. (1993) Strategies for optimizing protein expression and secretion in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In Baltz, R.H., Hegeman, G.D. and Skatrud, P.L. (eds) *Industrial microorganisms: basic and applied molecular genetics*. American Society for Microbiology, Washington, DC: pp. 119-126.
91. Sreekrishna K. 2010. *Pichia*, optimization of protein expression. In: Flickinger M. C., editor. *Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology*. Hoboken: Wiley, pp. 1-16.
92. Stemmer WP, Cramer A, Ha KD, Brennan TM, Heyneker HL. 1995. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene* 164(1): 49-53.
93. Stratton J., Chiruvolu V., Meagher M. 1998. High cell-density fermentation. En: *Pichia* Protocols, *Methods in Molecular Biology*, Ed. D.R. Higgins, J.M. Cregg. Vol. 103, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
94. Suzuki K, Hori A, Kawamoto K, Thangudu RR, Ishida T, Igarashi K, Samejima M, Yamada C, Arakawa T, Wakagi T, Koseki T, Fushinobu S. 2014. Crystal structure of a feruloyl esterase belonging to the tannase family: A disulfide bond near a catalytic triad. *Proteins* 82: 2857-2867.

95. Veana F, Aguilar CN, Rodríguez-Herrera R. 2011. Kinetic studies of invertase production by xerophilic *Aspergillus* and *Penicillium* strains under submerged culture. *Micol. Apl. Int.* 23: 37-45.
96. Viader-Salvadó JM, Castillo-Galván M, Fuentes-Garibay JA, Iracheta-Cárdenas, MM, Guerrero-Olazarán M. 2013. Optimization of five environmental factors to increase beta-propeller phytase production in *Pichia pastoris* and impact on the physiological response of the host. *Biotechnol. Prog.* 29: 1377-1385.
97. Weetal, H.H., Detar, C.C. (1985). Immobilized Tannase. *Biotechnol. Bioeng* 27: 124–127.
98. Wu M, Peng X, Wen H, Wang Q, Chen Q, McKinstry WJ, Ren B. 2013. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of tannase from *Lactobacillus plantarum*. *Acta Crystallogr. F. Struct. Biol. Cryst.Comm.* 69, 456–459.
99. Yamada K, Iibuchi S, Minoda Y. 1968. Studies on tannin acyl hydrolase of microorganisms. I. Isolation and identification of producing molds and studies on the conditions of cultivation. *Agricultural and Biological Chemistry.* 45: 233-240.
100. Yu XW, Li YQ. 2008. Expression of *Aspergillus oryzae* tannase in *Pichia pastoris* and its application in the synthesis of propyl gallate in organic solvent. *Food Technol. Biotechnol.* 46: 80-85.
101. Zeida, M., Wieser, M., Yoshida, T., Sugio, T., Nagasawa, T., 1998. Purification and characterization of gallic acid decarboxylase from *Pantoea agglomerans* T71. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4743–4747.
102. Zhang H. 2002 Protein Tertiary Structures: prediction from amino acid sequences. *Encyclopedia of Life Sciences*, Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group, England.
103. Zhong X, Peng L, Zheng S, Sun Z, Ren Y, Dong M, Xu A. 2004. Secretion, purification, and characterization of a recombinant *Aspergillus oryzae* tannase in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 36:165-169.

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

**José Antonio Fuentes Garibay**

Candidato para el Título Profesional de

**Doctor en Ciencias con Especialidad en Biotecnología**

**Tesis:** Secuencia de la tanasa de *Aspergillus niger* GH1 y producción de la enzima en *Pichia pastoris*.

**Campo de estudio:** Biotecnología

### **Biografía:**

**Datos personales:** Nacido en Monterrey, Nuevo León, el 02 de Octubre de 1980, hijo de Manuel Fuentes Fernández y Alicia Garibay Ruiz.

**Educación** Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Grado obtenido: Químico Bacteriólogo Parasitólogo (cédula 4725537).

Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Grado obtenido: Maestría en Ciencias con Acentuación en Microbiología (cédula 7197464).

### **Experiencia Profesional:**

- Realización de tesis de Licenciatura en el Laboratorio de Biotecnología Molecular (L5) del Instituto de Biotecnología de La Facultad de Ciencias Biológicas (U.A.N.L.) desde Enero del 2003.
- Realización de tesis de Maestría en el Laboratorio de Biotecnología Molecular (L5) del Instituto de Biotecnología de La Facultad de Ciencias Biológicas (U.A.N.L.) desde Enero del 2007.
- Realización de tesis de Doctorado en el Laboratorio de Biotecnología Molecular (L5) del Instituto de Biotecnología de La Facultad de Ciencias Biológicas (U.A.N.L.) desde Enero del 2011.